

**Vergleich von Quantifizierungsmethoden für Stickstoffmonoxid (NO)
in Proben biologischer Herkunft und Untersuchungen zum
NO-Stoffwechsel bei Patienten mit Sepsissyndrom**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)

eingereicht am
Institut für Pharmazie
der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
der Humboldt-Universität zu Berlin

von Nadja Richter
geboren am 5. Juni 1969 in Berlin

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin
Prof. Dr. H. Meyer

Dekanin der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I
Prof. Dr. V. Bonacic-Koutecky

Gutachter:

1. Prof. Dr. H.-H. Borchert
2. Prof. Dr. I. Schimke
3. PD Dr. W. Schaffartzik

Berlin, November 1997

Datum der Promotion: 13. Mai 1998

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
2	Theoretische Grundlagen	5
2.1	Eigenschaften, Biosynthese und Metabolisierung von Stickstoffmonoxid (NO)	5
2.1.1	Chemische und biochemische Eigenschaften von NO	5
2.1.2	Biosynthese von Stickstoffmonoxid	7
2.1.2.1	Biosynthese durch die NO-Synthasen	7
2.1.2.2	Regulation der NO-Biosynthese	10
2.1.3	Metabolisierung und Exkretion von endogen synthetisiertem NO	11
2.2	Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von NO	14
2.2.1	Funktionen im Blutgefäßsystem	14
2.2.1.1	Endothelfunktion	14
2.2.1.2	Hämostase	15
2.2.1.3	Pathophysiologie	16
2.2.2	Funktionen bei der Immunabwehr	17
2.2.2.1	NO als zytotoxischer Wirkstoff	17
2.2.2.2	Pathophysiologische Auswirkungen der gesteigerten NO-Synthese	17
2.2.3	Funktionen im Nervengewebe	18
2.2.4	Weitere Funktionen von NO	19
2.3	Analytische Möglichkeiten zum quantitativen NO-Nachweis	20
2.3.1	Direkte Quantifizierungsmethoden	20
2.3.2	Indirekte Quantifizierungsmethoden	21
2.3.2.1	Quantifizierung der NO-Biosynthese	21
2.3.2.2	Quantifizierung von NO-Metabolisierungs- und -Folgeprodukten	22
2.3.2.3	Quantifizierung paramagnetischer Reaktionsprodukte von NO	23
3	Methodische Untersuchungen	25
3.1	Nitrosylhämoglobin-Nachweis mittels ESR-Spektroskopie	26
3.1.1	Theoretische Grundlagen der Methode	26
3.1.2	Quantifizierung von Nitrosylhämoglobin – Ergebnisse und Diskussion	29
3.1.2.1	Simulation der ESR-Signale	30

3.1.2.2	Material und Methoden	31
3.1.2.3	Einflüsse auf die HbNO-Signalform	32
3.1.2.4	Quantitative Messungen	38
3.1.2.5	Nachweis von HbNO in humanen Blutproben	39
3.1.2.6	Konzentrierung der Proben mittels Lyophilisation	40
3.1.2.7	Zusammenfassung	42
3.2	ESR-spektroskopischer NO-Nachweis unter Nutzung des DETC-Eisen-(II)-Komplexes als NO-Fänger	42
3.2.1	Material und Methoden	43
3.2.2	Ergebnisse und Diskussion	44
3.2.3	Anwendung der Methode im tierexperimentellen Modell	47
3.3	Nitrit-/Nitratnachweis	50
3.3.1	Griess-Reaktion	50
3.3.1.1	Material und Methoden	51
3.3.1.2	Ergebnisse und Diskussion	51
3.3.2	Quantifizierung von Nitrit/Nitrat mittels HPLC	55
3.3.2.1	Material und Methoden	55
3.3.2.2	Methodenparameter	55
3.3.2.3	Einfluß der Ernährung auf den basalen Plasmanitrat-spiegel	56
3.3.3	Quantifizierung von Nitrat mittels GC-MS	59
3.3.3.1	Material und Methoden	59
3.3.3.2	Methodenparameter	60
3.3.3.3	Referenzwerte	60
3.3.3.4	Bestimmung der Nitratkonzentration im Augenkammerwasser	62
3.3.4	Vergleich der Nitrit-/Nitrat-Quantifizierungsmethoden	64
3.4	Nachweis von N ^ω -Hydroxy-L-arginin im Blutplasma als Maß der NO-Biosynthese	65
3.4.1	Material und Methoden	65
3.4.2	Methodenparameter	67
3.4.3	Referenzwerte	69
3.5	Western-Blot-Nachweis der Expression von NO-Synthasen	69
3.5.1	Material und Methoden	70
3.5.2	Methodenparameter	72
3.6	Bestimmung der NOS-Aktivität	72
3.6.1	Material und Methoden	74
3.6.2	Methodenparameter	75
3.7	Vergleich von NO-Quantifizierungsmethoden am Modell immunstimulierter Ratten	78
3.7.1	Material und Methoden	79
3.7.2	Ergebnisse der Untersuchungen	79
3.7.3	Diskussion	79
3.8	Nutzbarkeit der Methoden in der medizinischen Praxis	83

4	Patientenstudie: Sepsis und NO-Produktion	87
4.1	Sepsis	88
4.1.1	Sepsissyndrom	88
4.1.2	NO-Bildung bei Sepsis und ihre Folgen	90
4.2	Patienten	90
4.2.1	Angewendete Sepsiskriterien	90
4.2.2	Einteilung der Patienten	92
4.3	Nachgewiesene Parameter der NO-Produktion	92
4.3.1	Nitratkonzentration im Plasma	94
4.3.1.1	Nitratkonzentration und Differenzierung der Sepsis- patienten	94
4.3.1.2	Vergleich der Sepsispatienten-Gruppen	95
4.3.1.3	Korrelation der Nitratkonzentration mit physiologi- schen Parametern der Sepsis	100
4.3.1.4	Zeitverlauf der Nitratkonzentration im Plasma	105
4.3.2	N ^ω -Hydroxy-L-arginin im Plasma	108
4.3.2.1	Vergleich der N ^ω -Hydroxy-L-arginin- und der L- Arginin-Konzentrationen der Patientengruppen	108
4.3.2.2	Zeitlicher Verlauf der N ^ω -Hydroxy-L-arginin-Konzen- tration im Vergleich zur Nitratkonzentration	111
4.3.3	Nitrosylhämoglobin in den Erythrozyten	113
4.3.4	Expression und Aktivität der induzierbaren NO-Synthase in neutrophilen Granulozyten	114
4.3.4.1	Direkter Nachweis in fixierten Granulozyten mittels Immunofluoreszenz-Analyse	114
4.3.4.2	Western-Blot-Analyse	116
4.3.4.3	Nachweis der NOS-Aktivität	118
4.3.4.4	Diskussion	118
4.4	Zusammenfassung der Ergebnisse der Sepsisstudie	120
5	Zusammenfassung	123
	Anhang	125
	Abkürzungsverzeichnis	126
	Literaturverzeichnis	127
	Nachwort	137

1 Einleitung

In den letzten zehn Jahren ist ein Radikal in den Mittelpunkt des Interesses der medizinischen Forschung gerückt, das vorher nur in der Chemie der Stickoxide und in der Umweltchemie eine Rolle gespielt hat. Stickstoffmonoxid (NO) ist eines der kleinsten freien Radikale in der Natur. Seitdem die Existenz von NO im menschlichen Organismus sowie seine Beteiligung an vielfältigen physiologischen Regulationsmechanismen nachgewiesen werden konnte, ist diesem Radikal eine völlig neue Bedeutung zuzuordnen.

Beginn der Erforschung von NO im medizinischen Zusammenhang war die Suche nach einem molekularen Mediator, der vom Blutgefäßendothel freigesetzt wird und der die gefäßerweiternde Wirkung von Acetylcholin vermittelt [31]. In der Zeit zwischen 1983 und 1987 konnte gezeigt werden, daß dieser sogenannte Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) mit NO identisch ist. Damit wurde auch die zentrale Rolle, die NO bei der Regulierung des peripheren und zentralen Blutdrucks spielt, erkannt. Auch das wirksame Prinzip der in der Praxis lange als Koronartherapeutika eingesetzten sogenannten organischen Nitrate, deren vasodilatierende Wirkung durch NO-Freisetzung zustande kommt, konnte so geklärt werden. Heute ist bekannt, daß NO einer der wichtigsten intra- und interzellulären Mediatoren ist. Sein bisher beschriebenes physiologisches Wirkungsspektrum reicht von der Regulation des Blutdrucks und der Darmtätigkeit durch seine relaxierende Wirkung auf glatte Muskelzellen über Neurotransmitter-Funktionen und die Hemmung der Thrombozyten-Aggregation bis zur Beteiligung an der zellvermittelten Immunantwort.

Mit der Bedeutung von NO bei der Regulation physiologischer Vorgänge sind auch pathophysiologische Auswirkungen bei inadäquater NO-Bildung verbunden. So werden z. B. Erkrankungen des Blutgefäßsystems auch auf eine verminderte NO-Bildung zurückgeführt. Außerdem kann auch eine gesteigerte NO-Bildung pathophysiologische Konsequenzen haben. Für das Verständnis der Pathophysiologie und damit für die Entwicklung von Behandlungsmöglichkeiten ist es so unerlässlich, Meßmethoden zu finden, mit denen die NO-Bildung im Körper quantifiziert werden kann.

Das Ziel dieser Arbeit ist es, Quantifizierungsmethoden für in vivo gebildetes Stick-

stoffmonoxid (NO) bzw. dessen Metabolisierungsprodukte zu vergleichen und ausgewählte Methoden so zu optimieren, daß sie zur Durchführung klinischer und tierexperimenteller Studien einsetzbar sind. Die speziellen Eigenschaften von NO, wie z. B. die extrem kurze biologische Halbwertszeit, die hohe Reaktivität mit sehr verschiedenen physiologischen Substanzen sowie die freie Diffundierbarkeit sind dafür verantwortlich, daß es bisher nicht möglich ist, eine Standardmethode für den Nachweis der endogenen NO-Bildung anzugeben.

Es werden im ersten Teil dieser Arbeit insgesamt sechs verschiedene Methoden zur Quantifizierung des NO-Stoffwechsels beschrieben. Untersucht werden zwei Nachweise, durch die paramagnetische Reaktionsprodukte von NO mittels Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie) quantifiziert werden können. Der Nachweis des endogenen Nitrosylhämoglobins wird der Methode der Bildung und Detektion des Mononitrosyl-Eisen(II)-(Diethyldithiocarbamat)₂-Komplexes gegenübergestellt. Die Quantifizierung von Nitrat als stabiler Endstufe der NO-Metabolisierung ist auf verschiedene Weise möglich. Verglichen werden die Griess-Reaktion, die Quantifizierung mittels Hochleistungsflüssigkeits-Chromatographie (HPLC) sowie die Analyse mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS). Die Quantifizierung des Intermediär- und Nebenproduktes der NO-Biosynthese N^ω-Hydroxy-L-arginin mittels HPLC wird auf ihre Anwendbarkeit und im Vergleich zur Nitrat-Quantifizierung geprüft. Bei Verfügbarkeit von Zellen als Probenmaterial ist der Western-Blot-Nachweis der NO-Synthase-Expression möglich. Auch die Enzymaktivität der NO-Synthasen ist in Gewebe und Blutzellen bestimmbar. Diese beiden letztgenannten Verfahren können Aufschluß über die Lokalisierung dieser Enzyme sowie die Expressions- und Aktivierungsmechanismen geben. Die Brauchbarkeit der genannten Methoden zur Quantifizierung des NO-Stoffwechsels wird analysiert, und die meisten der untersuchten Methoden wurden auch in entsprechenden tierexperimentellen Studien überprüft.

Im zweiten Teil der Arbeit wird die NO-Produktion bei Patienten mit Sepsissyndrom in einer klinischen Studie quantifiziert. Bei diesem Krankheitsbild wird eine überschießende NO-Produktion für Blutdruckerniedrigung und Ausbildung des septischen Schocks verantwortlich gemacht. Durch Erfassung der veränderten NO-Bildung wird eine Analyse der Beeinflussung physiologischer Parameter durch NO ermöglicht. Diese Studie soll weiterhin den effektiven Einsatz von Medikamenten vorbereiten, die den NO-Stoffwechsel beeinflussen. Ein weiterer Aspekt wird mit der Untersuchung der Expression und Aktivität der induzierbaren NO-Synthase in weißen Blutzellen der Sepsispatienten einbezogen. Es ist bisher nicht bekannt, welche Rolle diese Zellen bei der NO-Produktion während der Sepsis spielen und der eindeutige Nachweis der

Existenz der induzierbaren NO-Synthase in den neutrophilen Granulozyten steht noch aus.

Der zunehmenden Bedeutung der Analytik in Medizin und Pharmazie wird im ersten Teil der Arbeit (Kapitel 3) Rechnung getragen. Dabei wurde versucht, nicht nur die üblichen Verfahren einzubeziehen, sondern durch Erweiterung des Methodenspektrums den hohen Ansprüchen gerecht zu werden, die an die Zuverlässigkeit der Quantifizierungsmethoden bei gleichzeitig geringem Zeit- und Kostenaufwand, gestellt werden.

In der klinischen Studie im zweiten Teil (Kapitel 4) wird neben den Fragestellungen hinsichtlich des NO-Stoffwechsels bei Sepsispatienten auch der methodische Aspekt des Nachweises der NO-Bildung mitbetrachtet.

Ein Kapitel, in dem die bisherigen Erkenntnisse zur Rolle von NO im Organismus zusammengefaßt sind, ist der Arbeit vorangestellt.

2 Theoretische Grundlagen

2.1 Eigenschaften, Biosynthese und Metabolisierung von Stickstoffmonoxid (NO)

2.1.1 Chemische und biochemische Eigenschaften von NO

Für einen biologischen Mediator besitzt Stickstoffmonoxid außergewöhnliche physikalisch-chemische Eigenschaften. NO ist eine farblose gasförmige Substanz mit einer relativ geringen Wasserlöslichkeit von 1 bis 3 mmol/l bei 20°C und 1 atm [56]. Dagegen verfügt es über eine hohe Lipophilie und ist ungeladen [4]. Mit einer Molmasse von 30 g/mol ist es eines der fünfzehn kleinsten stabilen Moleküle in der Natur. In biologischen Materialien kann NO unbegrenzt in alle Richtungen diffundieren, ohne daß Membranen eine Barriere darstellen. Bei einer Reichweite von 200 bis 600 μm können so mehrere 100 Zelldurchmesser durchquert werden [127]. Begrenzt wird diese Bewegung durch die hohe Reaktivität von NO. Mit seinem ungepaarten Elektron in einem antibindenden $2p\pi$ -Orbital und den damit verbundenen Radikaleigenschaften besitzt NO eine Gewebelbaltwertszeit von nur drei bis sieben Sekunden.

Von der komplexen Chemie dieses Radikals, die in enger Beziehung zur Chemie der Stickoxide steht, werden nachfolgend nur die Reaktionen in biologischen Medien betrachtet.

Wegen seines Radikalcharakters werden die Reaktionen von NO von der Stabilisierung des freien Elektrons bestimmt. Reaktionen mit anderen Radikalen führen zur Paarung der freien Elektronen. Andererseits sind Reaktionen mit Molekülen möglich, die freie Elektronen stabilisieren können. Übergangsmetallionen sind dabei wegen ihrer teilweise unbesetzten d-Orbitale bevorzugte Reaktionspartner. Die Energiedifferenz zwischen den Orbitalen mit ungepaartem Elektron ist hier kleiner als die Energie, die zur Paarung nötig wäre¹. Eine dritter Reaktionstyp von NO ist der nukleophile Angriff von Amino- und Thiolgruppen biologischer Strukturen.

Im biologischen Milieu sind in der ersten Gruppe von Reaktionen Sauerstoff,

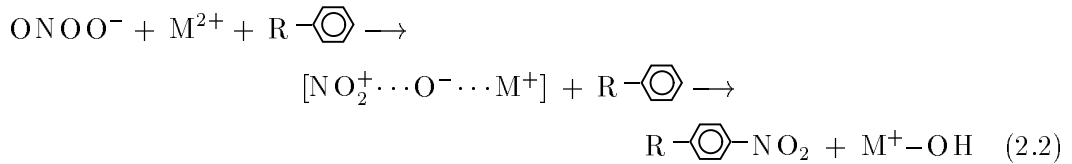
¹Hundsche Regel

Superoxidradikal-Anionen und Fettsäureperoxid-Radikale mögliche Partner. Durch das ubiquitäre Vorhandensein von Sauerstoff ist die Reaktion mit diesem Diradikal sehr wahrscheinlich. Dabei wird NO im wässrigen Medium zu Nitrit oxidiert, das in Gegenwart von Oxyhämoglobin zu Nitrat weiteroxidiert wird.

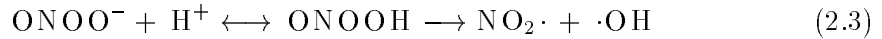
Das Reaktionsprodukt von NO und Superoxidradikal-Anionen ($O_2^{\cdot-}$) ist Peroxynitrit ($ONOO^-$) [4]:



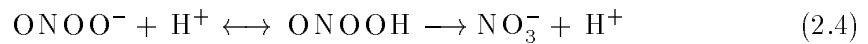
Diese Reaktion verläuft etwa dreimal schneller als die von $O_2^{\cdot-}$ mit der Superoxiddismutase (SOD), die $O_2^{\cdot-}$ zu O_2 und H_2O_2 dismutiert [35]. Die Reaktionen von Peroxynitrit sind vom pH-Wert oder der Anwesenheit von Übergangsmetallionen abhängig. Möglich sind Nitrierungsreaktionen an aromatischen Aminosäuren, die von Übergangsmetall-Ionen katalysiert werden (siehe Gleichung 2.2) [6, 111]. Dabei wird z. B. das durch Antikörperreaktionen oder HPLC nachweisbare Nitrotyrosin gebildet [64, 134].



Auch der homolytische Zerfall unter Bildung von Stickstoffdioxid und Hydroxylradikalen wird diskutiert [5, 22]:



In Abhängigkeit vom pH-Wert ist in einer intramolekularen Umlagerung die Detoxifizierung zu Nitrat möglich:



In der zweiten Gruppe der möglichen Reaktionen des NO-Radikals sind Eisen-Porphyrin-Zentren im biologischen Milieu bevorzugte Partner. Die Hämoglobinaffinität von NO ist etwa 10^3 mal höher als die von Kohlenmonoxid sowie 10^6 mal höher als die von Sauerstoff [49]. Bei Reaktion mit deoxygeniertem Hämoglobin kommt es zur Bildung von Nitrosylhämoglobin ($HbNO$), einer paramagnetischen Spezies, die im Blut nachgewiesen werden kann und die zu Methämoglobin und Nitrat weiteroxidiert wird. Durch die Reaktion von NO mit der Häm-Domäne der Guanylatcyclase wird der Mechanismus der Gefäßdilatation eingeleitet. Weitere biologische Metalloproteine, mit

denen NO reagieren kann, sind Häm-Oxygenase, Prostaglandin-H-Synthase, Lipoxigenase, Superoxid-Dismutase sowie Coeruloplasmin und Ferritin [50].

Eine wichtige Reaktion der dritten Gruppe ist die von NO mit den SH-Gruppen der Aminosäuren bzw. Proteine unter Bildung von S-Nitrosothiolen. Es wird angenommen, daß diese Verbindungen Transport- und Wirkform von NO sein könnten, da NO auf diese Weise stabilisiert wird und länger zur Verfügung steht. Da die S-Nitrosothiole aber sehr labil sind, unter spontaner NO-Freigabe reagieren und ihre Reaktionen außerdem in vielen Fällen denen von NO gleichen, steht der endgültige Beweis dafür noch aus [126]. Der mögliche Einsatz der S-Nitrosothiole in der Therapie als Broncho- bzw. Vasodilatoren wird wegen des nichtenzymatischen Weges der NO-Freigabe untersucht.

Die Reaktion von NO mit Aminogruppen als nukleophilen Reaktionspartnern führt zur Bildung von Nitrosaminen, die wegen ihrer Karzinogenität Bedeutung besitzen.

Die Reaktionsmöglichkeiten von NO und seinen Abkömmlingen sind vielfältig und das Geschehen komplex, so daß gerade in biologischen Systemen oft nicht vorausgesagt werden kann, welche der Reaktionen bevorzugt stattfinden.

2.1.2 Biosynthese von Stickstoffmonoxid

2.1.2.1 Biosynthese durch die NO-Synthasen

Seit 1987 ist bekannt, daß die Aminosäure L-Arginin die zytotoxische Wirkung von aktivierten Mäuse-Makrophagen steigert [60]. Der Ausgangsstoff der Biosynthese von NO war also schon bekannt, bevor NO als ein endogener Wirkstoff des Immunsystems identifiziert war. Auch die Endprodukte L-Citrullin sowie Nitrit und Nitrat sind im Zusammenhang mit der aktivierten Immunabwehr schon frühzeitig beschrieben worden [106]. Erst später wurde gezeigt, daß NO das wirksame Reaktionsprodukt der Oxidation von L-Arginin ist [87].

Heute ist bekannt, daß NO infolge einer fünffachen Elektronenübertragung aus L-Arginin entsteht, bei der 1,5 NADPH-Äquivalente und zwei Sauerstoffmoleküle verbraucht werden [32, 73, 86, 112]. Dabei wird eines der chemisch äquivalenten Guanidin-Stickstoffatome des L-Arginins oxidiert. Als einziges stabiles Zwischenprodukt der Biosynthese wurde N^ω -Hydroxy-L-arginin gefunden (siehe Abbildung 2.1). N^ω -Hydroxy-L-arginin kann vom aktiven Zentrum der NO-Synthasen wegdiffundieren und ist dann auch von anderen Cytochrom-P-450-Enzymen unter NO-Bildung verwertbar.

Die NO-Synthasen (NOS), die die beschriebene Biosynthese katalysieren, gehören zu einer Enzymfamilie [40]. Es sind bisher drei verschiedene Isoenzyme gefunden wor-

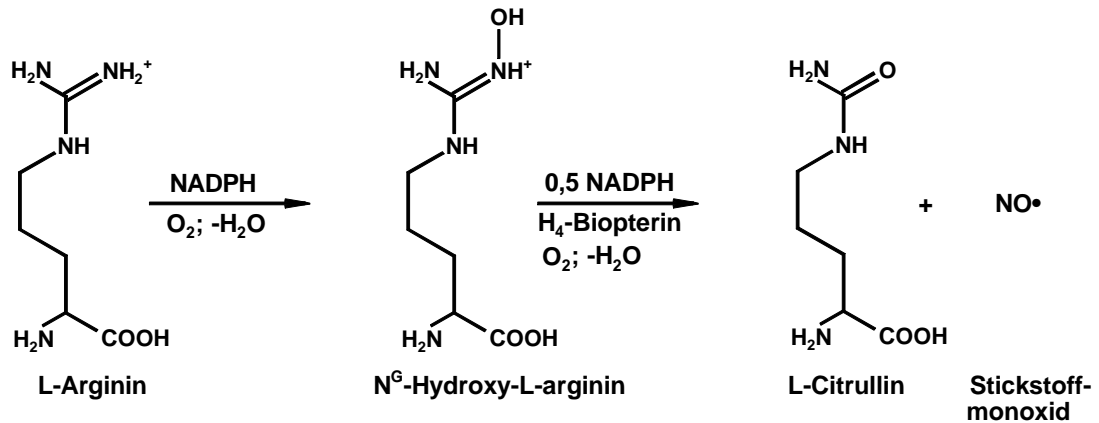


Abbildung 2.1: Schritte der NO-Biosynthese

den, die das Produkt unterschiedlicher Genorte sind. Zwischen diesen Enzymen besteht eine 50- bis 60%ige Aminosäurehomologie, was vor allem auf die nahezu identischen Kofaktorbindungsstellen zurückzuführen ist [40]. Prinzipiell sind die NO-Synthasen aus einer C-terminalen Reduktasedomäne und einer N-terminalen Oxidasedomäne aufgebaut. Die Reduktasedomäne besteht aus FAD sowie FMN und bindet NADPH, sie fungiert als Elektronenspeicher und -transporter. Die Oxidasedomäne ist das aktive Zentrum der Enzyme und ist aus einem Eisenprotoporphyrin (IX) des Typs Cytochrom-P-450 aufgebaut. Über die Bildung von radikalischen Zwischenstufen und Peroxy-Häm-Spezies wird die Oxidation des Substrates L-Arginin vermittelt [25, 32, 73]. Kofaktoren der NO-Synthasen sind neben NADPH (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin und Calmodulin/Calcium. Der Calmodulin-Calcium-Komplex verbindet die Oxidase- mit der Reduktasedomäne und vermittelt so den Elektronentransport. Damit hat er die Funktion eines Regulators der Enzymaktivität.

Bezüglich dieses Regulationsmechanismus unterscheiden sich die NOS-Isoenzyme. Die zwei bekannten konstitutiv exprimierten Synthasen (cNOS) sind in Abhängigkeit von der zellulären Calcium-Ionenkonzentration aktiv. Bei ihnen ist Calmodulin erst ab einer cytosolischen Calcium-Schwellenkonzentration am Enzym gebunden, die in aktivierten Zellen erreicht wird ($EC_{50} > 200 \text{ nmol/l}$). Die dann aktive Enzymkonformation produziert über Minuten NO [97, 101].

Bei der induzierbaren NO-Synthase (iNOS) ist Calmodulin dauernder Bestandteil des Enzyms [16], bzw. ist es bei einer sehr viel geringeren cytosolischen Calcium-Ionenkonzentration gebunden, die in jeder ruhenden Zelle überschritten ist [101]. So ist die iNOS nach einer Induktionszeit von 4 bis 6 Stunden calciumunabhängig aktiv und kann über Stunden bis Tage NO produzieren. Die Bildungsrate der iNOS liegt

zehnmal höher als die der konstitutiven Enzyme. Induktoren sind die Entzündungsmediatoren IL 1β , $\text{TNF}\alpha$, $\text{IFN}\alpha$ sowie Bakterien und deren Abbauprodukte, wie z. B. Endotoxine (Lipopolysaccharide) [97]. Synergistisch wirken Wachstumsfaktoren wie der Fibroblasten- oder der Epidermiswachstumsfaktor sowie Plasmin und cAMP [13, 102]. Die iNOS kann in nahezu allen Körpergeweben exprimiert werden. Sie wurde unter anderem in Hepatozyten, Makrophagen², Gefäßmuskelzellen, Gefäßendothelzellen, Fibroblasten, Nierenzellen, Chondrozyten, kardialen Myozyten und Inselzellen des Pankreas nachgewiesen [97, 100]. Es liegen auch Berichte über das Vorkommen der iNOS in Thrombozyten [91] und in neutrophilen Granulozyten vor [11, 143]. Allerdings sind in den verschiedenen Geweben unterschiedliche Induktorkombinationen wirksam. In der aktiven Form ist die iNOS ein Homodimer mit einer Molekülmasse von 130 kD je Untereinheit.

Die Verbreitung der beiden konstitutiven Enzyme ist auf wenige Körperzelltypen beschränkt. Die endotheliale cNOS (ecNOS)³ ist in allen Gefäßendothelzellen zu finden, wo sie entscheidenden Anteil an der Regulation der Blutgefäßspannung hat. Sie wird neben der Calciumabhängigkeit durch rezeptorgebundene Agonisten wie Acetylcholin, Bradykinin, Adeninnukleotide, Serotonin, Substanz P, Thrombin sowie die Wirkung von Scherkräften (*shear stress*) an der Gefäßwand aktiviert [13]. Die beiden erstgenannten Neurohormone wirken durch die intrazelluläre Calcium-Konzentrationserhöhung aktivierend auf die NOS. Im Gegensatz zu den anderen beiden NO-Synthasen ist die aktive Form der ecNOS hauptsächlich plasmamembranassoziiert, wobei eine Myristylierung der N-terminalen Seite der ecNOS bei Aktivierung beschrieben wurde [82].

Die dritte NO-Synthase wurde zuerst in Nervenzellen des Zentralnervensystems gefunden und als neuronale cNOS bezeichnet (ncNOS), sie tritt jedoch auch in Zellen des peripheren Nervensystems sowie in Skelettmuskelzellen, im Pankreas und in der Niere auf [68, 96, 100]. Mit einer Molekülmasse von 160 kD und einer um 232 Aminosäuren längeren Proteinkette ist die ncNOS größer als die beiden anderen Isoenzyme [123].

²Bei menschlichen Makrophagen ist noch nicht eindeutig erwiesen, ob sie zur NO-Bildung in der Lage sind, da bisher im Gegensatz zu anderen Zellen in vitro keine Produkte des NO-Stoffwechsels nachgewiesen werden konnten.

³Es gibt verschiedene Nomenklaturen für die Isoenzyme der NO-Synthase. Für die im Text verwendeten Abkürzungen sind in der Literatur folgende Synonyme zu finden:

iNOS: induzierbare NOS, macNOS, NOS II

ecNOS: endotheliale konstitutive NOS, eNOS, NOS III

ncNOS: neuronale konstitutive NOS, nNOS, bNOS, NOS I.

2.1.2.2 Regulation der NO-Biosynthese

Die Regulation der NO-Synthese erfolgt sowohl auf prätranslationaler als auch auf posttranslationaler Ebene. Für die iNOS ist die prätranslationale Regulation besonders wichtig. So ist für die Induktion der Enzymexpression durch LPS ein Promoter verantwortlich, an den unterschiedliche Transkriptionsfaktoren regulierend binden können. Unter anderem ist der Nuklearfaktor κB (NF κB) ein entscheidender Steuerungsfaktor [42, 102]. Gehemmt wird die iNOS-Induktion durch TGF β^4 , IL 4, IL 8 [123], den Makrophagen-Deaktivierungsfaktor [101], Wachstumsfaktoren wie PDGF $_{AB}$, PDGF $_{BB}^5$, IGF 6 , durch Thrombin [13] sowie Corticosteroide wie Dexamethason [102]. Die Regulation erfolgt über eine veränderte NOS-Genexpression sowie über verringerte Translation oder Stabilität der iNOS-mRNA.

Für die posttranslationale Regulation der Enzymaktivität sind neben der schon beschriebenen Calcium-Ionenabhängigkeit die Verfügbarkeit von Substraten und Kofaktoren sowie die Produkthemmung des Enzyms durch NO selbst über einen negativen feed-back-Mechanismus von Bedeutung [41]. Als weiterer posttranslationaler Hemmungsmechanismus wird die Phosphorylierung der NOS durch die Proteinkinase C diskutiert, wobei die NO-Synthase-Aktivität durch die Aufhebung der Membranassoziiierung reguliert wird [35, 123].

Die Verfügbarkeit des NO-Synthese-Ausgangsstoffes L-Arginin in der Zelle wird durch zwei Mechanismen beeinflusst: Die Synthese von L-Arginin kann in der Zelle selbst erfolgen und L-Arginin wird aus der Zellumgebung über den Kationen-Aminosäuretransporter y^+ in die Zelle transportiert. Es wird angenommen, daß die L-Arginin-Konzentration einen regulierenden Einfluß auf die NO-Synthese hat, da durch L-Arginin-Infusionen gefäßerweiternde Effekte bewirkt werden können [24].

Hauptbildungsorte der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin sind die Leber und die Niere. In der Leber wird L-Arginin direkt vom Harnstoffzyklus übernommen und abgebaut, während in der Niere aus dem extrahierten Plasma-L-Citrullin L-Arginin gebildet und in die Zirkulation abgegeben wird [97]. Dies sind neben der Nahrung die Quellen von L-Arginin im Organismus.

Es sind aber auch viele Zellen selbst in der Lage, in einem Rezyklisierungsmechanismus L-Arginin aus L-Citrullin zurückzubilden [47]. Die dazu notwendigen Enzyme Argininosuccinat-Synthase und Argininosuccinat-Lyase wurden identifiziert. Darüber hinaus wird sogar eine Koinduktion von iNOS und Argininosuccinat-Synthase – dem

⁴Transforming growth factor

⁵PDGF: Platelet derived growth factors

⁶IGF: Insulin like growth factor

geschwindigkeitslimitierenden Enzym der L-Arginin-Rückbildung – vermutet [97].

Die Aufnahme von L-Arginin in die Zelle erfolgt über den Transporter für basische Aminosäuren y^+ [46, 121, 141]. Um diesen Transporter konkurrieren neben L-Arginin die Aminosäuren L-Lysin, L-Ornithin sowie N^ω -Hydroxy-L-arginin und die argininanalogen NOS-Hemmer. Eine induzierbare Unterart des y^+ -Transporters wurde kürzlich identifiziert (MCAT-2B) und in Zusammenhang mit der Beeinflussung der NO-Biosynthese gebracht [97].

Der Abbau von L-Arginin zu Ornithin wird über eine zelleigene Arginase katalysiert. Einer der stärksten Hemmer dieses Enzyms ist das Zwischenprodukt der NO-Biosynthese N^ω -Hydroxy-L-arginin. Es wird vermutet, daß durch diesen Mechanismus die lokale L-Arginin-Konzentration reguliert wird [46]. Eine völlige Unabhängigkeit der NO-Synthese von der Plasma-Arginin-Konzentration scheint aber nicht zu existieren.

(6R)-Tetrahydrobiopterin besitzt nicht nur die Funktion eines Kofaktors, sondern reguliert über einen allosterischen Mechanismus die L-Arginin-Affinität der NO-Synthasen [67], so daß auch die Verfügbarkeit dieser Substanz die Aktivität der NOS beeinflussen kann.

Durch die in-vitro- und in-vivo-Hemmung der NO-Synthasen beim Einsatz von Enzyminhibitoren konnte in vielen Fällen die Beteiligung des NO-Stoffwechsels an physiologischen Mechanismen gezeigt werden. Mit der N^ω -Substituierung von L-Arginin wird eine kompetitive Enzymhemmung erreicht, die jedoch nicht in jedem Gewebe in gleichem Maße erfolgt. Gebräuchliche L-Arginin-Analoga sind N^ω -Monomethyl-L-arginin (L-NMMA), N^ω -Nitroargininmethylester (L-NAME), N-Iminoethyl-Ornithin (L-NIO) und N^ω -Amino-L-arginin (L-NAA). Der Einsatz von Aminoguanidin als selektiver Inhibitor der induzierbaren NO-Synthase zeigte, daß trotz der beibehaltenen Kompetitivität des Mechanismus eine 15- bis 40fach stärkere Hemmung im Vergleich zu den konstitutiven Isoenzymen erreicht wird. Das wird auf eine stärkere Affinität zum aktiven Zentrum der iNOS zurückgeführt [62].

2.1.3 Metabolisierung und Exkretion von endogen synthetisiertem NO

Für die Untersuchung der Nachweismöglichkeiten von NO im Körper ist die Kenntnis der stabilen Produkte der NO-Metabolisierung, der Geschwindigkeit der beteiligten Reaktionen sowie der Exkretionsraten dieser Produkte Voraussetzung.

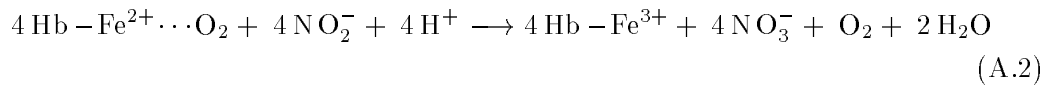
Schon am Biosyntheseort von NO bestehen vielfältige Reaktionsmöglichkeiten mit den zellulären Bestandteilen. Wie im Abschnitt 2.1.1 beschrieben, spielen hier reaktive Sauerstoffspezies, molekularer Sauerstoff, Eisenzentren sowie die SH-Gruppen von Proteinen bzw. Enzymen als Reaktionspartner die Hauptrolle.

Im Blut sind Nitrit und Nitrat die Hauptabbauprodukte von NO [137, 144]. Für diese Oxidation lassen sich drei verschiedene Reaktionswege aufführen.

A. Die Reaktion von NO mit gelöstem Sauerstoff führt in wässrigen Systemen zur Bildung von Nitrit [4]:



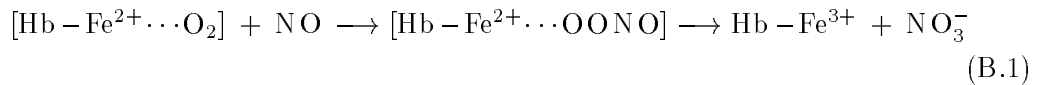
In biologischem Milieu kann das aber nicht der Hauptreaktionsweg sein, da für diese Reaktion dritten Grades die Konzentrationen von NO zu gering sind, um nötige Reaktionsgeschwindigkeit zu erreichen [4]. Aus in-vitro-Experimenten ist bekannt, daß Nitrit durch arterielles Blut sehr schnell und semiquantitativ zu Nitrat oxidiert wird [138]. Das Ausmaß dieser Reaktion hängt vom Anteil oxygenierten Hämoglobins im Blut ab, das bei dieser Reaktion selbst zu MetHb oxidiert wird⁷:



Die Methämoglobinbildung durch Nitrit wird bei Säuglingen für die Ausbildung einer Methämoglobinämie verantwortlich gemacht. Bei Säuglingen reagieren durch die erhöhte reduktive Kapazität der Darmflora auch Nitrate als Methämoglobinbildner.

Im venösen Blut reagiert Nitrit zum Teil auch zu Nitrosylhämoglobin, wobei hier ein reduktiver Schritt beteiligt sein muß.

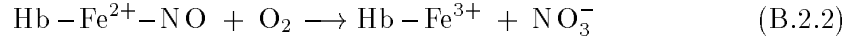
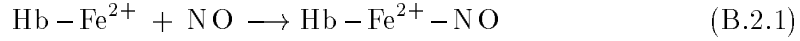
B. Die Oxidation von NO zu Nitrat wird durch das zweiwertige Eisen des Hämoglobins katalysiert. Einerseits kann dabei NO mit oxygeniertem Hämoglobin direkt zu Nitrat und Methämoglobin reagieren (B.1),



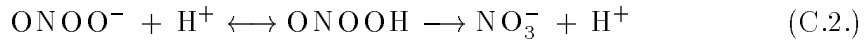
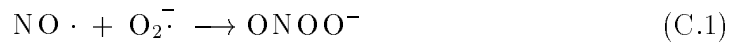
andererseits reagiert NO mit deoxygeniertem Hämoglobin zu Nitrosylhämoglobin (B.2.1). Trotz dessen relativ hoher Stabilität⁸ ist durch die Reaktion mit Sauerstoff die Bildung von Nitrat möglich. HbNO fungiert in diesem Falle als Intermediat der oxidativen Umwandlung (B.2.2):

⁷Die gezeigte Summengleichung umschreibt einen komplizierteren Reaktionsmechanismus, an dem H_2O_2 und andere radikalische Zwischenstufen beteiligt sind [75].

⁸Die biologische Halbwertszeit liegt zwischen zwei und drei Stunden [50].



C. Eine weitere wichtige Reaktion ist die zwischen Superoxidanionen-Radikalen und NO, wobei unter anderem den Leukozyten die $\text{O}_2^{\cdot-}$ -produzierende Rolle zukommt (C.1). Das hochreaktive Peroxynitrit reagiert entweder mit Blut- oder Zellbestandteilen weiter (Oxidationen, Nitrierungen) oder es wird zu Nitrat umgelagert (C.2.) [4, 57].



Wie sich durch Inhalations- und Ingestionsexperimente zeigen läßt, ist in jedem Falle Nitrat das Hauptmetabolisierungsprodukt [137, 144].

Der Hauptexkretionsweg von Nitrit und Nitrat ist die renale Ausscheidung. Die durchschnittliche Nitrat-Clearance beträgt 25 ml/min. Da nach Ingestion von Nitrat die Nitrat-Clearance dem 25- bis 40fachen Wert der Kreatinin-Clearance entspricht, kann auf eine hauptsächlich tubuläre Ausscheidung geschlossen werden [21]. Diese Daten machen außerdem deutlich, daß die renale Exkretion von der Nitratkonzentration im Blut abhängt und erst bei pathologisch verringerter Nierenfunktion eine Abnahme der Exkretionsrate zu erwarten ist. Die Folge ist dann eine Erhöhung der Plasma-Nitratkonzentration. Die Erfassung von renal ausgeschiedenem Nitrat ist nur bedingt als Maß für die NO-Produktion anwendbar, da nur ca. 75% des in NO-Inhalationsstudien aufgenommenen NO im Urin wiederfindbar sind [144], wobei nach 24 Stunden erst 40% ausgeschieden waren.

Ein weiterer Ausscheidungsweg ist die aktive Exkretion von Nitrat im Speichel, wo dieses zu Nitrit reduziert werden kann. Wegen der Reabsorption im Gastrointestinaltrakt wird dieses Nitrit und Nitrat jedoch wieder in den Gesamthaushalt aufgenommen. Ein Teil kann im Gastrointestinaltrakt durch die Darmflora zu Ammoniak bzw. Stickstoff reduziert werden.

Hinzu kommt, daß in der Atemluft gasförmiges NO erfaßt werden kann [43], das offensichtlich endogen in den Bronchien oder Nasennebenhöhlen gebildet wird. Da eine Aufnahme ins Blut nicht vollständig erfolgt, fließt diese Menge nicht in die Gesamtbilanz ein [43].

In Abbildung 2.2 sind die Hauptexkretionswege von NO im Körper schematisch dargestellt.

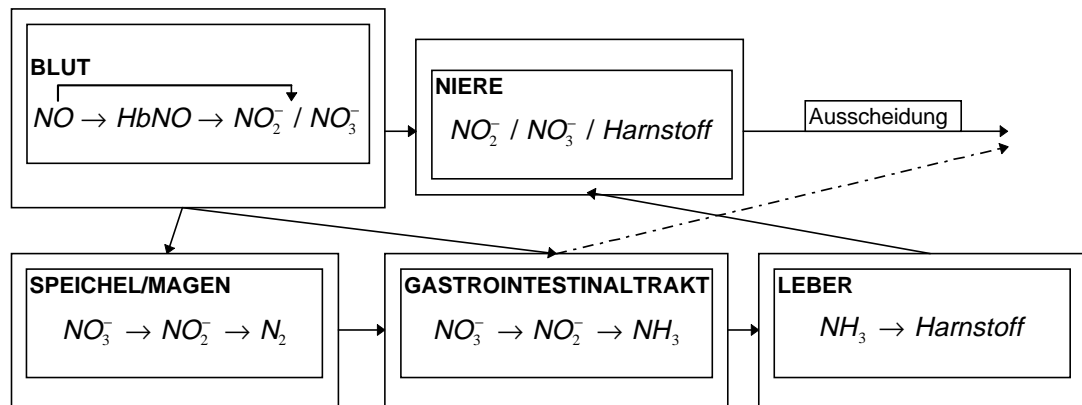


Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Abbau- und Exkretionswege von NO nach [144]

2.2 Physiologische und pathophysiologische Bedeutung von NO

2.2.1 Funktionen im Blutgefäßsystem

2.2.1.1 Endothelfunktion

Das Blutgefäßendothel besitzt wesentliche Regulationsfunktionen für die lokale Blutgefäßspannung. Ein endothelfreies Gefäß ist nicht mehr in der Lage, auf kurzfristig veränderte Bedingungen zu reagieren und diese entsprechend auszugleichen [14, 31]. Für diese regulatorische Aufgabe sind mehrere endotheliale Mediatorengruppen verantwortlich: neurohumorale Mediatoren, Hormone, Arachidonsäurederivate, Endothelium-derived relaxing factor (EDRF) sowie Endothelium-derived hyperpolarisation factor (EDHF).

Stickstoffmonoxid ist als Endothelium-derived relaxing factor ein Hauptmediator der durch verschiedene Stimuli hervorgerufenen Blutgefäßrelaxation. Die in den Endothelzellen konstitutiv vorliegende NO-Synthase wird durch erhöhte intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration, Scherkräfte sowie verschiedene in Abschnitt 2.1.2.1 erwähnte Substanzen aktiviert und produziert innerhalb kurzer Zeiträume NO. Das kann frei in Richtung Gefäßlumen sowie in die glatten Gefäßmuskelzellen diffundieren. In den Gefäßmuskelzellen bindet NO an die Häm-Domäne der löslichen Guanylat-

cyclase (sGC). Es ist auch möglich, daß die NO-Transportform S-Nitrosothiole sind, die dann leicht NO freigeben.

Durch die kovalente Bindung von NO am Häm-Fe²⁺ der sGC wird mit der Bildung eines ternären Nitrosyl-Häm-Enzymkomplexes das Eisen-Ion aus der Hämebene herausgehoben und die Bindung zum axialen Eisenliganden geschwächt [59]. Es kommt zur Konformationsänderung der Guanylatcyclase nahe des katalytischen Zentrums, wodurch die Affinität der sGC zum Substrat Magnesium-GTP sowie zu Magnesium-Ionen stark erhöht und die Reaktionsgeschwindigkeit der Bildung des second messengers cGMP⁹ um das 50- bis 200fache gesteigert wird [58]. Die lösliche bzw. zytosolische Guanylatcyclase ist ein Heterodimer mit je einem Häm je Enzymmolekül [30]. Sie ist durch Methylenblau hemmbar [56, 88].

cGMP aktiviert Proteinkinasen, Phosphodiesterasen und Ionenkanäle. Das kann einerseits zur Phosphorylierung und anschließender Dephosphorylierung der leichten Myosinketten führen, wodurch es zur Muskeler schlaffung kommt [68]. Andererseits ist der Haupteffektuierungsweg die Erniedrigung der intrazellulären Calcium-Ionenkonzentration durch erhöhte cGMP-Spiegel. Dadurch wird die Muskelkontraktion gehemmt [13], und die damit verbundene Gefäßerweiterung führt zur Blutdrucksenkung. Die Guanylatcyclase wird nach NO-Abspaltung wieder deaktiviert.

Die Aktivität der endothelialen NO-Synthase ist nicht in allen Gefäßabschnitten gleichermaßen ausgeprägt. So hat das arterielle System einen höheren NO-Tonus als das venöse, dafür ist dieses wiederum sensibler gegenüber NO-freisetzenden Pharmaka [68]. In den distalen Arterienabschnitten ist die basale NO-Bildung stärker ausgeprägt als in den proximalen [53], was den Schluß zuläßt, daß die Scherkräfte einen entscheidenden Anteil an der basalen NO-Produktion besitzen.

2.2.1.2 Hämostase

Eine zweite Funktion, die NO im Blutgefäßsystem zukommt, ist die Regulation der Thrombozytenfunktionen. Hatte man anfangs noch angenommen, daß die Thrombozyten nur durch das endothelial freigesetzte NO beeinflusst werden [114], ist inzwischen nachgewiesen, daß diese Zellen des Blutes über einen eigenen NO-Stoffwechsel verfügen [91, 115]. NO hemmt die Thrombozytenaggregation, die Thrombozytenadhäsion an die Blutgefäßwände sowie die Sekretion vasoaktiver Substanzen, wie z. B. ADP oder Serotonin durch aggregierende Thrombozyten. Damit wirkt NO antithrombotisch und dient der Aufrechterhaltung des lokalen Blutflusses. Auch in den Thrombozyten werden diese Funktionen über die Guanylatcyclase-Aktivierung und die daraus folgende

⁹cGMP: zyklisches Guanosinmonophosphat

Verringerung der intrazellulären Calciumkonzentration vermittelt. Eine Erhöhung der Calcium-Ionenkonzentration ist das zelluläre Hauptsignal für Formwandel, Adhäsion, Sekretion sowie Aggregation von Thrombozyten.

Aggregierende Thrombozyten stimulieren aber auch die Freisetzung von NO aus den Gefäßendothelzellen. Einerseits kommt es dadurch zur Hemmung der weiteren Thrombozytenaggregation, andererseits wird durch NO die Vasokonstriktion gehemmt, die durch die thrombozytäre Sekretion vasoaktiver Substanzen vermittelt wird [68, 83].

2.2.1.3 Pathophysiologie

Die pathophysiologische Veränderung der endothelialen Regulationsfunktion führt zur Störung der Gefäßfunktion, die mit einer Änderung der Gefäßstruktur und -elastizität, gesteigerter Adhäsion von Thrombozyten und Leukozyten und der Einlagerung von Cholesterin verbunden ist. Diese Prozesse führen letztlich zu Artherosklerose und Thrombosis, in deren Folge Krankheitsbilder, wie ischämische Herzkrankheit, Herzinfarkt und Schlaganfall entstehen können [17].

Es konnte nachgewiesen werden, daß mit gestörter Endothelfunktion eine verminderte NO-Bildung verbunden ist, die mit der Pathophysiologie der essentiellen Hypertonie, von pulmonaler Hypertonie, von Atherosklerose und Hypercholesterinämie sowie Mikroangiopathien bei Diabetes mellitus in Zusammenhang gebracht wird [127]. Eine Störung der NO-Bildung hat eine verminderte Dilatation der Gefäße oder sogar eine paradoxe Vasokonstriktion als Antwort auf Acetylcholin zur Folge. Weiterhin ist eine verstärkte Reaktion auf vasokonstriktorisch wirkende Substanzen, eine erhöhte Thrombozytenadhäsion und -aggregation und die gesteigerte Proliferation glatter Gefäßmuskulzellen beobachtet worden [45]. Dadurch kommt es zur Verstärkung atherosklerotischer Läsionen. Mit der dabei erhöhten Superoxidanionen-Radikal-Bildung wird der Effekt des NO-Mangels noch gesteigert. Bei Diabetes mellitus wird außerdem ein NO-quenching-Effekt durch glycosylierte Substanzen diskutiert [12]. Sogar die geschlechtsbedingten Unterschiede des Auftretens von Atherosklerose lassen sich auf unterschiedliche basale NO-Konzentrationen zurückführen, da nachgewiesen wurde, daß Östrogene einen Einfluß auf die eNOS-Expression haben [18].

Therapeutische Ansätze zur Kompensation der pathophysiologisch verminderten NO-Produktion sind beispielsweise der Einsatz von Nitrovasodilatoren bei Angina pectoris, die intravenöse L-Arginingabe zur Erhöhung der endogenen NO-Produktion [24] sowie die erfolgreiche NO-Beatmung von Patienten mit Schocklungensyndrom (ARDS) [117].

2.2.2 Funktionen bei der Immunabwehr

2.2.2.1 NO als zytotoxischer Wirkstoff

Im Rahmen der Immunabwehr kommt es zu einer Induktion der iNOS durch Zytokine und Endotoxine und nachfolgend zur langanhaltenden NO-Produktion in Leukozyten, Hepatozyten, glatten Gefäßmuskelzellen, Endothelzellen und vielen anderen Körperzellen.

NO besitzt Eigenschaften, die im Rahmen der unspezifischen Abwehr eine Schädigung oder Abtötung von Tumorzellen, Bakterien, Protozoen, Viren und Pilzzellen bewirken [68, 96, 100]. Beim direkten Angriff von NO an der DNA kommt es zu Mutationen und Desaminierungen; darüberhinaus wird die DNA-Neusynthese durch Inaktivierung der Ribonukleotidreduktase gehemmt. Durch den Angriff an Enzymsystemen durch NO werden lebenswichtige Reaktionen der Zellen blockiert: die mitochondriale Atmung durch Inaktivierung der Komplexe I und II der Elektronentransportkette, der Krebszyklus durch Blockierung der Aconitase. Es kommt zur Reaktion mit Enzymen, die Eisen-Schwefel-Cluster enthalten, aber auch zu einer gesteigerten Abwehr durch Neutrophile und Makrophagen, da durch die NO-vermittelte Erhöhung der cGMP-Konzentration eine gesteigerte Freisetzung lysosomaler Enzyme und eine gesteigerte Phagozytoseaktivität hervorgerufen wird [56]. Andererseits wird die Leukozyten-Adhäsion gehemmt, was einen antiinflammatorischen Aspekt des NO-Einflusses bedeutet [77, 78].

Reagiert NO mit gleichzeitig freigesetzten $O_2^{\cdot-}$ -Radikalen, wird Peroxynitrit gebildet, das selbst sehr reaktiv ist und außerdem in $NO_2^{\cdot-}$ und OH^{\cdot} -Radikale zerfallen kann, die ihrerseits oxidativ in das Abwehrgeschehen eingreifen können [5].

2.2.2.2 Pathophysiologische Auswirkungen der gesteigerten NO-Synthese

Wegen der Unspezifität der beschriebenen Reaktionen, die in bestimmtem Maße notwendig für die immunologische Abwehr sind [84], können bei extremer Verstärkung der Immunreaktion auch schädigende Einflüsse auf das körpereigene Gewebe erwartet werden. So wird die Beteiligung von NO an der Ausbildung der septischen Leber diskutiert: Es kommt durch NO zur reversiblen Hemmung der totalen Protein-, Fibrinogen- sowie Albuminsynthese in den Hepatozyten [23]. Außerdem wird die Synthese immun-suppressiv wirkender Metabolite der Arachidonsäurekaskade unterdrückt [68]. Die Leber ist andererseits gerade durch Scavenger-Moleküle besser gegen den NO-Einfluss geschützt als beispielsweise Tumorzellen [105].

Im Gefäßsystem führt die starke NO-Bildung zu einer Beeinflussung der Blutge-

fäßspannung. Der gleiche Mechanismus, der für die regionale Durchblutungsregulation verantwortlich ist, kann nun zu einer systemischen Blutdruckerniedrigung führen, die außerdem eine Hyporeaktivität gegenüber Vasokonstriktoren zur Folge hat. Es wird angenommen, daß die Wirkung von NO einen nicht unbedeutenden Anteil an der Ausbildung des therapieresistenten septischen Schocks besitzt. Therapieversuche, die überschießende NO-Produktion durch den Einsatz von NO-Synthase-Inhibitoren zu hemmen, führten bisher aber noch nicht zu einer Erhöhung der Überlebensrate beim septischen Schock. Trotz der nachweisbaren systemischen Blutdruckerhöhung bei Einsatz der Enzyminhibitoren, konnte eine Erniedrigung des kardialen Ausstoßes sowie des kardialen Indexes beobachtet werden. Außerdem kommt es durch die unspezifische Hemmung sowohl der induzierbaren wie auch der endothelialen konstitutiven NO-Synthase zu regionalen Durchblutungsstörungen, die die verminderte Organperfusion weiter verstärken [10, 27, 103, 108].

Ein anderer Aspekt der pathophysiologischen Bedeutung von NO ist die Beteiligung an Autoimmunreaktionen, wie z. B. bei der Entwicklung des Diabetes mellitus Typ I. So konnte durch Anwendung von NO-Synthase-Hemmern im Tiermodell die Zerstörung der Langerhansschen Inseln gehemmt werden [69]. Auch bei rheumatoider Arthritis, Colitis ulcerosa, systemischem Lupus erythematosus sowie bei Transplantatabstoßungen wird eine Störung des NO-Gleichgewichtes diskutiert.

2.2.3 Funktionen im Nervengewebe

NO spielt sowohl im peripheren wie auch im Zentralnervensystem eine wichtige Rolle als Neurotransmitter. Das dritte Isoenzym, die neuronale konstitutive NO-Synthase, übernimmt hier die NO-Produktion nach Aktivierung, die z. B. über die erhöhte intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration vermittelt wird [96]. Im Zentralnervensystem ist die NO-Synthase vor allem im Cerebellum konzentriert, sie kommt aber auch in anderen Abschnitten vor. Besonders in den exzitatorischen Bahnen wird durch Erregung der Glutamaterezeptoren die intrazelluläre Calcium-Ionenkonzentration erhöht. Das daraufhin synthetisierte NO kann in die Nachbarzellen diffundieren, z. B. in die präsynaptische Nervenzelle, Gliazellen oder glatte Muskelzellen. Hier moduliert NO durch die Aktivierung der cGMP-Bildung den Informationsfluß. Durch die für einen Neurotransmitter ungewöhnliche freie Beweglichkeit von NO können benachbarte Zellen schnell und unabhängig von synaptischen Verbindungen erreicht werden [68]. So dient NO der Informationsübertragung zwischen parallelen Nervenbahnen, besitzt aber auch für die Ausprägung von Synapsen und damit für Lernvorgänge sowie für die zentrale Schmerzwahrnehmung Bedeutung [96].

Außerdem ist NO im Gehirn über den lokalen Blutgefäßmechanismus an der Regulation der cerebralen Durchblutung beteiligt. Störungen dieses Mechanismus werden in Zusammenhang mit Migräne-Kopfschmerz gebracht.

Im peripheren Nervensystem wird NO die Rolle eines nonadrenergen-non-cholineren (NANC) Neurotransmitters zugeschrieben. Die neuronale NO-Synthase wurde vor allem in den Nerven des Gastrointestinaltraktes gefunden und wird hier für reflexartige Relaxationen verantwortlich gemacht [83]. Weiterhin kann aus parasympathischen Nerven der Adventitia bestimmter großer Blutgefäße NO ausgeschüttet werden, was direkt zur Erschlaffung der Gefäßmuskelzellen und damit zur Vasodilatation führt [83].

2.2.4 Weitere Funktionen von NO

Auch in weiteren Organen kann NO das physiologische Gleichgewicht beeinflussen.

In der Niere wird einerseits der lokale Blutdruck unter Mitbeteiligung von NO reguliert. Dies ist für die glomeruläre Filtration von Bedeutung, die durch Dilatation des Vas afferens und einer damit gesteigerten Nierendurchblutung forciert wird. Auch die glomeruläre und medulläre Mikrozirkulation werden durch endogenes NO reguliert [100]. Durch diese Modulationen wird auch die Reninausschüttung mitbeeinflusst. Renin ist in den Blutgefäßen ein physiologischer Gegenspieler von NO [124].

In der Lunge kann eine basale NO-Produktion durch die in den Epithelzellen lokalisierte iNOS nachgewiesen werden. Eine Beteiligung von gestörter NO-Bildung an der Ausbildung von Asthma bronchiale wird diskutiert, da durch NO-Beatmung eine Bronchienerweiterung erreicht werden kann. Außerdem ist die verminderte Immunität bei Anwendung glucocorticoidhaltiger Aerosole auch mit der gehemmten Induktion der iNOS im Lungenepithel erklärbar. Das zeigt, welche wichtige Rolle NO in der pulmonalen Abwehr spielt.

Die große Breite der physiologischen Funktionen und deren Überschneidungen machen deutlich, daß die separate Betrachtung von bestimmten Effekten nur in modellhaften Experimenten möglich ist und daß die Erfassung der systemischen NO-Konzentration nur bedingt Aussagen über die damit verbundenen lokalen Auswirkungen zuläßt.

2.3 Analytische Möglichkeiten zum quantitativen NO-Nachweis

Es gibt verschiedene Ansätze zur Quantifizierung der NO-Biosynthese. Neben direkten NO-Meßmethoden werden Stoffe erfaßt, die in Zusammenhang mit der NO-Biosynthese und -Metabolisierung stehen, wie zum Beispiel L-Citrullin, N^ω-Hydroxy-L-arginin oder Nitrit und Nitrat. Es wird aber auch der Nachweis der NO-Synthase-Expression und -Aktivität als Maß der NO-Biosynthese genutzt. Die ersten Experimente der NO-Forschung stützten sich auf Bioassays, bei denen die Auswirkungen der Hemmung der NO-Biosynthese durch kompetitive Inhibitoren auf physiologische Parameter analysiert wurden [94, 114]. Auch die Messung des second messengers cGMP als Produkt der Effektuierungskaskade von NO ist zu erwähnen. Weiterhin sind verschiedene Möglichkeiten beschrieben, die stabilen Abbauprodukte von NO oder aber paramagnetische Reaktionsprodukte z. B. mittels ESR-Spektroskopie zu erfassen.

2.3.1 Direkte Quantifizierungsmethoden

Es gibt nur begrenzte Möglichkeiten des direkten NO-Nachweises in biologischen Systemen, da die hohe Reaktivität und kurze biologische Halbwertszeit der direkten Detektion von NO entgegenstehen. Eine sehr sensitive und spezifische Methode ist die Chemiluminiszenz-Methode, bei der durch die Reaktion von NO mit Ozon Licht emittiert wird. Die Lichtmenge kann mittels Photomultiplier proportional zur NO-Menge registriert werden [146]. NO muß dabei in der Gasphase vorliegen; daher kann NO beispielsweise in der Atemluft direkt gemessen werden [43]. Zu analysierende Flüssigkeiten können durch Entgasung mit Inertgas der Messung zugeführt werden. Voraussetzung ist die relative Stabilität von NO im Probenmaterial, so daß Zellzuchtüberstände gut für die Messung verwendbar sind, während sich hämoglobinhaltige Proben nicht eignen. Die Methode weist eine hohe NO-Spezifität auf, lediglich auf Störungen durch DMSO wird verwiesen. Die Nachweisgrenze liegt zwischen 1 und 20 pmol/l. Damit ist die Chemiluminiszenzmethode mit Abstand die NO-Nachweismethode mit der höchsten Sensitivität [2].

Die Entwicklung von Elektroden zur spezifischen Messung von NO direkt am Bildungsort ist ein Weg, der Ergebnisse bezüglich der lokalen Mechanismen der NO-Biosynthese und -Wirkung zuläßt. Die Elektroden basieren auf dem Prinzip, daß entweder die Elektrodenbeschichtung spezifisch für Gase oder NO durchlässig ist [55] oder eine für NO spezifische Reaktion das Meßsignal erzeugt. Beispielsweise ist die Reaktion von NO mit Metallporphyrinen ein in der Erprobung befindliches Prinzip [85]. Die

Gestaltung der Elektroden als Mikrosensoren läßt sogar die Messung der NO-Freigabe einer einzelnen Zelle zu [85]. Die Nachweisgrenze liegt im nanomolaren Bereich. Noch sind die vorhandenen Elektroden aber sehr störanfällig und reagieren auf Scherkräfte wie auch auf Katecholamine oder Substanzen mit hohem Redoxpotential¹⁰.

2.3.2 Indirekte Quantifizierungsmethoden

Bei den indirekten Verfahren der NO-Quantifizierung kommen einerseits Methoden in Frage, die als Maß für die NO-Biosynthese-Rate gelten. Andererseits werden stabile Metabolisierungsprodukte oder Reaktionsprodukte von NO mit zugefügten Substanzen erfaßt.

2.3.2.1 Quantifizierung der NO-Biosynthese

Die Bestimmung von Zwischen- oder Endprodukten der Biosynthese ist im Gesamtorganismus nicht ohne weiteres durchführbar. Das Zwischenprodukt N^ω-Hydroxy-L-arginin dürfte entsprechend des enzymatischen Mechanismus nicht in meßbaren Konzentrationen vorhanden sein, und das Synthese-Nebenprodukt L-Citrullin ist wiederum Substrat des Harnstoffzyklus sowie der Rückreaktion zu L-Arginin über Aminosuccinat. Dennoch konnte gezeigt werden, daß N^ω-Hydroxy-L-arginin im Plasma meßbar ist [46, 92].

Der Nachweis der NO-Synthase-Expression durch Western-Blot-Analyse läßt die Beobachtung von Einflüssen auf den Expressions- und Induktionsmechanismus des Enzyms zu, nicht aber Schlußfolgerungen über die Aktivität der NO-Synthase unter den entsprechenden Bedingungen oder über eine veränderte NO-Produktion. Die NO-Bildung kann durch die unterschiedlichen posttranslationalen Einflüsse von der gefundenen NO-Synthase-Konzentration abweichen.

Untersuchungen der Enzymaktivität werden in vitro durchgeführt, wobei die Umwandlung von radioaktiv markiertem L-Arginin in L-Citrullin analysiert wird. Eine andere Möglichkeit ist die Messung von Methämoglobin, das bei der Oxidation von Oxyhämoglobin durch NO gebildet wird. In beiden Fällen kann man nicht davon ausgehen, die gleichen Bedingungen nachzuvollziehen, die im Organismus vorherrschen, da Transportprozesse durch Membranen, L-Arginin-Verfügbarkeit und andere Bedingungen im Aktivitätsassay optimiert werden. Die Aktivitätsbestimmung ist aber eine der wirklichen NO-Produktion näher kommende Methode als der Western-Blot-Nachweis der Existenz des Enzyms.

¹⁰eigene Beobachtungen mit der Elektrode ISO-NO von World Precision Instruments

2.3.2.2 Quantifizierung von NO-Metabolisierungs- und -Folgeprodukten

Die Quantifizierung der in Abschnitt 2.1.3 diskutierten Metabolisierungsprodukte ist eine Möglichkeit, die es erlaubt, auch Proben zu analysieren, die in klinischen oder tierexperimentellen Studien erhalten werden. Durch die weitgehende Stabilität der innerhalb kurzer Zeit nichtenzymatisch gebildeten Oxidationsprodukte Nitrit bzw. Nitrat sind diese wichtige Marker der NO-Biosynthese. Methämoglobin wird als Nebenprodukt der NO-Oxidation im Blut durch die erythrozytäre MetHb-Reduktase zu Hämoglobin reduziert und ist damit kein Parameter für in-vivo-Studien, während in erythrozytenfreien in-vitro-Versuchen die NO-vermittelte Oxidation von Hb zu MetHb spektrophotometrisch durchaus mit hoher Sensitivität meßbar ist [65]. Interferenzen durch das oxidative Potential von Nitrit sind dabei aber nicht auszuschließen.

Für die Bestimmung der Metabolisierungsprodukte Nitrit und Nitrat sind in-vitro-Untersuchungen zur Stabilität der Ionen im Blut Voraussetzung. So ist wegen der katalytischen Aktivität von Hämoglobin bei der Umwandlung von Nitrit in Nitrat die Quantifizierung von Nitrit allein nicht repräsentativ für die NO-Bildung. Im Vollblut wurde eine Abnahme der Nitritkonzentration von 95% innerhalb einer Stunde bei Raumtemperatur nachgewiesen, während die Nitratkonzentration nach abgeschlossener Umwandlung von Nitrit in Nitrat stabil ist [98]. Das heißt, daß im Blut entweder die Summe aus Nitrit- und Nitratkonzentration gemessen werden sollte oder die Nitratkonzentration allein. Bei Patientenstudien ist jedoch der Einfluß der Nahrung auf die Nitrit-/Nitratkonzentration zu beachten. Die Ergebnisse der methodischen Untersuchungen dazu sind in Abschnitt 3.3.2.3 dargestellt. In hämoglobinfreien Medien ist die Messung von Nitrit eine repräsentative Methode zur Erfassung der NO-Bildung.

Die ESR-spektroskopische Detektion des paramagnetischen Produktes der Reaktion von NO mit deoxyHb Nitrosylhämoglobin (HbNO) stellt eine weitere Möglichkeit des Nachweises von NO dar [26, 74]. Der Vorteil dieser Methode liegt einerseits in der Nutzung eines endogenen NO-Fängers und andererseits in ihrer Spezifität, da im Blut lediglich NO als Ausgangsstoff für die HbNO-Bildung in Frage kommt. In vitro läßt sich HbNO auch aus deoxyHb und Nitrit unter Einfluß starker Reduktionsmittel darstellen. Das wurde von Wennmalm et al. genutzt, indem Plasmanitrit an Agarose-Säulen, an denen Hämoglobin fixiert ist, unter reduktiven Bedingungen zu HbNO umgewandelt wurde und dann ESR-spektroskopisch bei einer Temperatur von 77 K gemessen wurde [139]. Der allgemeinen Nutzung dieser Methode stehen allerdings die oben genannten Probleme der Erfassung von Nitrit entgegen.

Der second messenger cGMP kann mittels kommerziell verfügbarer Radioimmunoassay-Kits gemessen werden. Ein Nachteil der Methode ist, daß cGMP nicht aus-

schließlich durch die lösliche Guanylatcyclase nach NO-Freisetzung gebildet wird, sondern eine partikuläre Isoform der GC existiert, die beispielsweise durch den atrialen natriuretischen Faktor aktiviert wird. Somit lassen sich die Ergebnisse nicht uneingeschränkt auf die NO-Wirkung zurückführen.

2.3.2.3 Quantifizierung paramagnetischer Reaktionsprodukte von NO

Wegen des mit den Radikaleigenschaften verbundenen Paramagnetismus von NO ist die ESR-Spektroskopie eine verbreitete NO-Nachweismethode. Ein direkter NO-Nachweis ist nicht möglich, da in wässriger Lösung bei den üblichen Mikrowellenfrequenzen zwischen 9 und 35 GHz weder bei Raumtemperatur noch im gefrorenen Zustand ein ESR-Signal meßbar ist [50].

Ähnlich wie beim Hämoglobin, ist das Prinzip des NO-Nachweises durch Bildung des Mononitrosyl- Fe^{2+} -(Diethyldithiocarbamat)₂-Komplexes die Stabilisierung des Radikals NO am Fe^{2+} . Diethyldithiocarbamat (DETC) muß in das Untersuchungsmaterial gebracht werden und komplexiert hier zweiwertiges Eisen als Fe^{2+} -(DETC)₂-Komplex. Dadurch wird eine Stabilisierung von NO am Eisenzentrum ermöglicht [79, 95, 99].

Beim Einsatz von Spintraps als NO-Fänger werden paramagnetische Spinaddukte gebildet. Sie reagieren aber nicht spezifisch mit NO. Der Vergleich von Nitronen einerseits und Nitrosoverbindungen andererseits zeigte, daß Nitrosoverbindungen Vorteile bezüglich ihrer Spezifität besitzen. Durch den Einsatz der Nitroso-Verbindungen ist eine bessere Identifizierung des angreifenden Radikals möglich, so daß Artefakte eher ausgeschlossen werden können. Nachteil dieser Spintrapgruppe ist aber ihre geringe Stabilität, die es notwendig macht, unter Lichtausschluß zu arbeiten [2, 3]. Außerdem besitzen diese Substanzen selbst physiologische Effekte in den untersuchten Systemen, wie z. B. eine Vasodilatation durch POBN¹¹ und TEMPOL¹², die nicht auf eine Wechselwirkung mit dem NO-Stoffwechsel zurückgeführt werden kann [71] oder auch eine Hemmung der Thrombozytenaggregation durch DNBBS¹³ und MNP¹⁴ [110].

Der Einsatz von Imidazolinoyl-N-oxiden, z. B. PTIO¹⁵ und Carboxy-PTIO, als Spinsonden soll eine erhöhte Spezifität für NO mit sich bringen. Die Ausgangsverbindung N-Oxid wird durch NO reduziert, das dabei selbst zu Nitrit wird. Durch Analyse der ESR-Spektrenveränderung in Folge der Reduktion der Spinsonde ist NO quantifizierbar [1].

¹¹POBN: α -(4-Pyridyl-1-oxid)-N-tert-butylnitron

¹²TEMPOL: 4-Hydroxy-2,2,6,6-tetramethylpiperidinyloxy

¹³DBNBS: 3,5-Dibrom-4-nitrosobenzensulfonat

¹⁴MNP: 2-Methyl-2-nitrosopropan

¹⁵PTIO: 2-Phenyl-4,4,5,5-tetramethylimidazolin-1-oxyl-3-oxid

Der Nachteil des Einsatzes von exogenen Substanzen, die NO-Fänger-Eigenschaften besitzen, ist, daß diese erst dem Modell zugeführt werden müssen. Trotz der bisher gezeigten Unschädlichkeit vieler NO- bzw. Spintraps ist ihre Verwendung am Menschen in vielen Fällen nicht vertretbar. Außerdem sind Eigenwirkungen und Verteilungsphänomene im Körper mit zu berücksichtigen.

Die Vielzahl der beschriebenen methodischen Ansätze zeigt, daß es nicht möglich ist, eine allgemein verwendbare Methode der NO-Quantifizierung anzugeben. Für in-vitro-Untersuchungen können leichter Methoden gefunden werden, die jedoch bezüglich der Sensitivität hohen Anforderungen gerecht werden müssen. Die Auswahl der Quantifizierungsmethoden für in-vivo-Studien ist wegen der vielfältigeren Reaktionsmöglichkeiten von NO und Verdünnungseffekten bei lokaler NO-Produktion sehr viel komplizierter. Ausgewählte methodische Ansätze werden im folgenden Kapitel ausführlicher beschrieben und bezüglich ihrer Anwendbarkeit diskutiert.

3 Methodische Untersuchungen

Nachdem im vorigen Abschnitt ein Überblick über die methodischen Möglichkeiten des Nachweises und der Quantifizierung von NO in Proben biologischer Herkunft gegeben wurde, werden im folgenden einzelne Methoden hinsichtlich ihrer Zuverlässigkeit, Aussagekraft und des mit ihnen verbundenen Aufwandes untersucht. Durch diese Betrachtungen kann die Brauchbarkeit von Methoden bewertet werden.

Zwei ESR-spektroskopische NO-Nachweismöglichkeiten werden in den Abschnitten 3.1 und 3.2 untersucht. Die ESR-Spektroskopie ist eine Methode, die noch keine allgemeine Verbreitung in Pharmazie und Medizin gefunden hat und die auch in der Chemie bisher nicht routinemäßig eingesetzt wird. Zum einen liegt dies an der recht aufwendigen technischen Ausstattung, die notwendig ist; andererseits erfordert die Interpretation von ESR-Spektren tiefergehendes Verständnis der chemischen Struktur der untersuchten Stoffe.

Zur Quantifizierung der NO-Metabolisierungsprodukte Nitrit bzw. Nitrat werden im Abschnitt 3.3 drei Verfahren verglichen. Der Nitrit- und Nitratnachweis ist die Methode, die bei Untersuchungen des NO-Stoffwechsels am häufigsten eingesetzt wird. Voraussetzung ist eine Prüfung der Zuverlässigkeit der Methoden.

Im Abschnitt 3.4 wird die Quantifizierung von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin betrachtet. Diese Aminosäure kann sich bei stimulierter NO-Biosyntheserate vom katalytischen Zentrum der NO-Synthasen entfernen und tritt aus den Zellen in die Blutbahn über. Da bei einem Teil der in Kapitel 4 untersuchten Patienten N^{ω} -Hydroxy-L-arginin im Plasma analysiert wurde, werden dort einige methodische Aspekte mitbetrachtet, die sich aus dem Vergleich mit der L-Arginin- und der Nitratkonzentration ergeben.

In den Abschnitten 3.5 und 3.6 des Kapitels werden zwei Methoden diskutiert, die die Expression bzw. Aktivität der NO-Synthasen widerspiegeln. Es wird dabei nicht die stattgefundene NO-Produktion in vivo quantifiziert, sondern der Zustand untersucht, in dem sich die NO-produzierenden Enzyme befinden.

Bei Anwendung der untersuchten Methoden in einem tierexperimentellen Infektionsmodell in Abschnitt 3.7 werden die NO-Quantifizierungsmethoden zur Beschreibung des NO-Stoffwechsels genutzt und ihre Aussagekraft verglichen.

3.1 Nitrosylhämoglobin-Nachweis mittels Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie)

Der ESR-spektroskopische Nachweis der paramagnetischen Spezies Nitrosylhämoglobin (HbNO) ist Gegenstand der folgenden Abschnitte. Da auch Einflüsse auf die Struktur dieser komplexen Verbindung untersucht wurden, ist eine theoretische Einführung zur ESR sowie zum sterischen Aufbau von Hämoglobin und Nitrosylhämoglobin vorangestellt.

3.1.1 Theoretische Grundlagen der Methode

Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie

Die Elektronenspin-Resonanz-Spektroskopie (ESR-Spektroskopie¹) beruht auf der Absorption von elektromagnetischer Energie durch Stoffe mit ungepaarten Elektronenspins (paramagnetische Stoffe), die sich in einem äußeren Magnetfeld befinden. In einem Magnetfeld können magnetische Dipole wie die Spinmomente der Elektronen verschiedene diskrete Orientierungen bezüglich der äußeren Feldrichtung einnehmen. Jeder Orientierung entspricht dabei ein Zustand bestimmter Zeeman-Energie. Zwischen diesen Zuständen können hochfrequente magnetische Felder magnetische Dipol-Übergänge induzieren. Diese sind von einer Absorption elektromagnetischer Energie begleitet und können so nachgewiesen werden. Die Frequenz des Hochfrequenz-Feldes ν , die Flußdichte des äußeren Magnetfeldes B_0 und der g -Wert, der Aussagen über die Wechselwirkungen des ungepaarten Elektrons mit seiner Umgebung zuläßt, stehen dabei in folgender Beziehung (mit h = Planck'sche Konstante, β = Bohrsches Magneton):

$$h \cdot \nu = g \cdot \beta \cdot B_0$$

Wesentlich für die Interpretation von ESR-Spektren ist die Möglichkeit der Wechselwirkung des Elektronenspinmomentes mit Kernspinmomenten sowie die Richtungsabhängigkeit der g -Werte bei Molekülen, dessen ungepaartes Elektron sich nicht in einem reinen s-Orbital befindet. Diese Richtungsabhängigkeit beeinflusst die Spektrengestalt dann, wenn das Molekül gegenüber dem äußeren Feld keine schnelle Reorientierung mehr erfährt (eingefrorene Lösungen, Makromoleküle) [140]. ESR-Untersuchungen sind in allen Aggregatzuständen möglich; üblich sind Messungen an festen und flüssigen Proben. Farbe, Transparenz und sonstige Zusammensetzung der

¹auch EPR für electron paramagnetic resonance

Proben sind im allgemeinen ohne Einfluß auf die Meßbarkeit, da selektiv paramagnetische Stoffe detektiert werden. Messungen bei tiefen Temperaturen sind leicht durchführbar, erhöhen die Empfindlichkeit und sind besonders bei labilen Proben von Vorteil [129].

Hämoglobinstruktur

Für die Quantifizierung von ESR-Signalen des Nitrosylhämoglobins (HbNO) ist die Betrachtung der Hämoglobinstruktur Voraussetzung, da damit eine Interpretation der komplexen HbNO-ESR-Signale ermöglicht wird.

Bei der intensiven Untersuchung von Hämoglobin und seiner Funktionen in den achziger Jahren diente Nitrosylhämoglobin als paramagnetisches Äquivalent zum oxygenierten Hämoglobin (oxyHb), da die Kristallstrukturen von oxyHb und HbNO sehr ähnlich sind² [48, 52, 70, 107, 130]. Das diamagnetische oxyHb ist nicht mittels ESR nachweisbar.

Auf der Grundlage der Beschreibung der Hämoglobinstruktur ist es möglich, den Funktionsmechanismus der Sauerstoffübertragung zu verdeutlichen. Ein Hämoglobinemolekül³ ist in seiner Quartärstruktur aus vier Untereinheiten aufgebaut, wobei je zwei α - und zwei β -Untereinheiten mit jeweils 141 bzw. 146 Aminosäuren unterschieden werden. In oberflächlichen Nischen ist in jeder Untereinheit ein Porphyrin-Ring mit Fe^{2+} als Zentral-Ion enthalten. Der proximale Ligand des Eisen-Ions ist das unprotonierte Stickstoffatom eines Histidin-Moleküls der F8-Helix im Globinteil. Distal können Liganden wie Sauerstoff, Kohlenmonoxid oder NO angreifen, oder aber der Histidin-Stickstoff der E7-Helix übernimmt die Besetzung dieser Stelle (siehe Abbildung 3.1). Die sterische Variabilität der Quartärstruktur der Proteinketten hat Auswirkungen auf die physiologischen Eigenschaften von Hämoglobin. So werden z. B. die kooperative Sauerstoffbindung und der Bohr-Effekt auf eine Konformationsänderung der Quartärstruktur zurückgeführt, die als R-T-Übergang bezeichnet wird. Die oxygenierte Form des Hämoglobins ist entspannt und befindet sich im R-Zustand (R-state, relaxed). Das heißt, daß durch die Quartärstruktur der Globine das Porphyrin- Fe^{2+} in sechsfacher Koordination vorliegt und die restlichen Porphyrine des Moleküls eine hohe Sauerstoffaffinität aufweisen. Bei Deoxygenierung oder pH-Werterniedrigung ist ein R-T-Übergang zu beobachten, wobei im T-Zustand (T-state, tensed) eine Streckung

²Die Elektronenspindichte ist in HbNO jedoch größer als in oxyHb oder HbCO, was Auswirkungen auf die Stärke der Bindung zum proximalen Histidin und die Bindungslängen von Fe^{2+} hat [107].

³In diesem Fall wird HbA₁ beschrieben, das den Hauptanteil des Hämoglobins gesunder Erwachsener ausmacht.

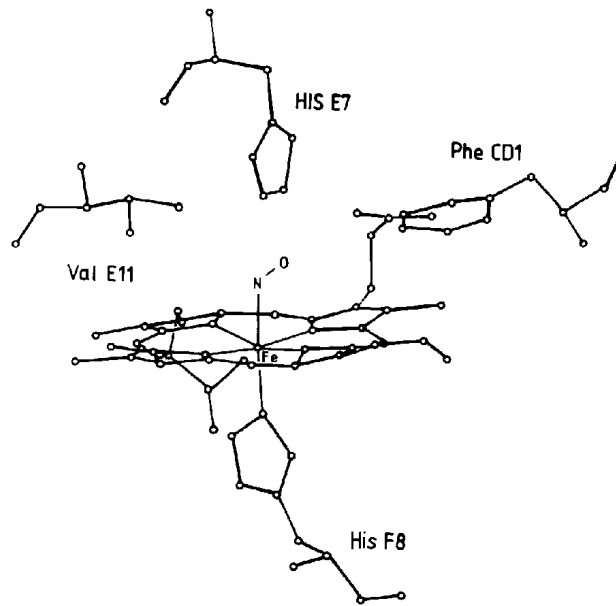


Abbildung 3.1: Porphyrinring einer HbNO-Untereinheit nach [63]

des Porphyrinringes erfolgt. Das Zentral-Ion Fe^{2+} wird dabei aus der Porphyrinebene herausgehoben und die Koordination zum proximalen Histidin ist geschwächt; einige Autoren sprechen vom Brechen der Bindung [49, 130]. Die Sauerstoffaffinität des Gesamtmoleküls ist nun niedriger als im entspannten Zustand. Diese Änderung der Quartärstruktur ist vor allem in den α -Hb-Untereinheiten nachweisbar [54, 76].

Nitrosylhämoglobin-Struktur und ESR

Nitrosylhämoglobin (HbNO) entsteht bei der Reaktion von deoxygeniertem Hämoglobin (deoxyHb) mit NO. Es wird mit einer 10^6 fach höheren Affinität gebildet als oxyHb. Nitrosylhämoglobin hat paramagnetische Eigenschaften, da das freie Elektron von NO durch die Fe^{2+} -Elektronenhülle stabilisiert wird ($S=\frac{1}{2}$) [50].

Beim ESR-Signal des Nitrosylhämoglobins handelt es sich um ein komplexes Signal. Die näherungsweise rhomboedrische Symmetrie des paramagnetischen Zentrums hat ein ESR-Spektrum zur Folge, für dessen Beschreibung drei g -Werte heranzuziehen sind: g_x , g_y und g_z . Es konnte auch ein axialer Anteil im Spektrum beobachtet werden ($g_x = g_z \neq g_y$), der bei höheren Temperaturen zunehmend das Spektrum beeinflusst und auch bei 77 K im ESR-Spektrum zu finden ist [54]. Da sich α - und β -Hämoglobinstruktur unterscheiden, sind die g -Werte der Spektren dieser Unterein-

heiten mit rhomboedrischer Symmetrie ungleich. Die axialen Komponenten der α - und β -Untereinheit sind nahezu identisch. Das heißt, das ESR-Signal ist bis hierher aus drei Signalkomponenten zusammengesetzt: α -HbNO; β -HbNO und α,β -HbNO mit axialer Symmetrie.

Eine Änderung der Kristallsymmetrie beim R-T-Übergang von HbNO zeigt sich auch im ESR-Spektrum des Nitrosylhämoglobins. Wie im ESR-Abschnitt beschrieben, bestehen zwischen Elektronenspin-Moment und Kernspin-Moment Wechselwirkungen (Kopplungen). Diese lassen Aussagen über die Anzahl benachbarter NMR-aktiver Kerne und über die Struktur des paramagnetischen Zentrums zu. Ähnlich wie der g -Wert ist auch die Hyperfein-Kopplungskonstante a eine richtungsabhängige Größe, so daß zusätzlich zu g_x, g_y, g_z auch a_x, a_y, a_z auftreten. Tritt der ungepaarte Elektronenspin mit dem Kernspin eines Stickstoffkerns ($I = 1$) in Wechselwirkung, ergibt sich eine Aufspaltung des Spektrums in drei Linien.

Das ESR-Spektrum von HbNO ist dann bei jedem g -Wert in drei Linien aufgespalten, wenn das freie Elektron mit dem Stickstoffkernmoment von NO koppelt, was im T-Zustand durch die geschwächte Eisen-Histidin-Bindung der Fall ist [49, 54]. Zu den oben genannten Teilspektren des HbNO-Signals kommt noch das von α -HbNO im T-Zustand hinzu, das durch die Kopplung des Elektronenspins mit einem Stickstoffkern die typische Dreilinienaufspaltung im Hochfeldbereich zeigt (Beispiel in Abbildung 3.3(b)).

Liegt Hämoglobin dagegen im R-Zustand vor, bei dem die Bindung zum proximalen Stickstoffkern besteht, kommt es zur Wechselwirkung des Elektronenspins mit zwei Stickstoffkernmomenten: mit dem von NO und dem vom proximalen Histidin. Das führt zu einer zusätzlichen Aufspaltung der Linien, so daß die für α -HbNO im T-state typische Signalaufspaltung nicht mehr erkennbar ist [54, 74] (Abbildung 3.3(a)).

Die ESR-Signalforn von HbNO ist also abhängig von der Kristallstruktur der Fe^{2+} -Porphyrinringe. In Abhängigkeit von den Eigenschaften der HbNO-Umgebung lassen sich ESR-Signalveränderungen detektieren, die durch die Veränderlichkeit der sterischen Verhältnisse von HbNO bestimmt werden.

3.1.2 Quantifizierung von Nitrosylhämoglobin – Ergebnisse und Diskussion

Da die Quantifizierung der ESR-Signale von HbNO bei unterschiedlichen ESR-Signalfornen ermöglicht werden soll, wird im folgenden der Ansatz der Entwicklung eines HbNO-Spektrenkataloges durch Simulation der ESR-Signale beschrieben. Um die Quantifizierbarkeit von HbNO im Blut zu erreichen, waren Experimente zu den

Einflüssen auf die HbNO-ESR-Signalform Voraussetzung. Von den vielfältigen in der Literatur beschriebenen Beeinflussungsmöglichkeiten des ESR-Signals wurden lediglich im System Blut relevante Parameter untersucht. Neben der Veränderlichkeit der ESR-Signalform ist die Möglichkeit der Quantifizierung auch von der prinzipiellen Nachweisbarkeit von HbNO in Patientenmaterial abhängig. Daß die Erfüllung dieser Anforderung problematisch ist, wird in Abschnitt 3.1.2.5 diskutiert.

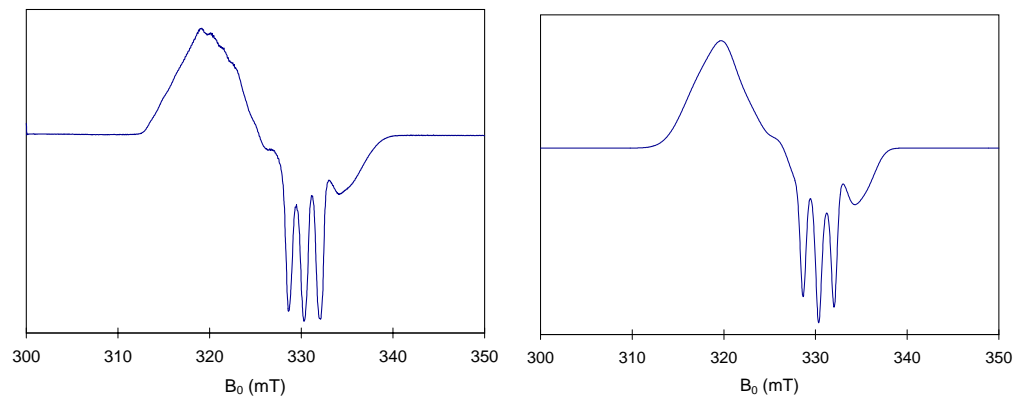
3.1.2.1 Simulation der ESR-Signale

Auf Grundlage der Betrachtungen im Abschnitt 3.1.1 wurde die Simulation von HbNO-Signalen mit dem Ziel der Entwicklung einer quantitativen Auswertungsmethode durchgeführt. Die Berechnung der Signale bei Vorlage experimenteller Daten führt zum besseren Verständnis der Signalform und ihrer Änderungen und dient der Überprüfung der Modellvorstellungen. In Abbildung 3.2(b) ist die Simulation eines Spektrums aus einer axialen und zwei rhomboedriscen Teilkomponenten mit den in Tabelle 3.1 gezeigten Daten dargestellt. Die Simulationen wurden mit dem Programm *COMPAR* durchgeführt.

Die Addition der Teilspektren in unterschiedlichem Verhältnis ist mit möglichen NO-Besetzungsunterschieden der Hb-Untereinheiten erklärbar. Es ist erkennbar, daß die Aufspaltungen des abfallenden Signalteils bei $B_0 \approx 320$ mT im experimentellen Spektrum 3.2(a) beim simulierten Spektrum fehlen. Die Vervollständigung des simulierten ESR-Spektrums würde die Addition von mindestens einer weiteren Komponente erfordern. Auf der Grundlage der vorliegenden experimentellen komplexen Spektren ist

Tabelle 3.1: Daten für die Simulation des in Abbildung 3.2(b) gezeigten ESR-Spektrums

	Komponente A (Anteil = 1) rhomboedrisch			Komponente B (Anteil = 0,3) axial			Komponente C (Anteil = 0,3) rhomboedrisch		
<i>g</i> -Werte	2,079	2,05	2,002	2,042	2,01	2,01	2,04	1,99	1,974
Kopplungs- konstanten <i>a</i> (mT)	2,5	1,6	0,4	2,0	1,6	2,0	2,0	1,0	1,4
Linienbreiten (mT)	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,7	1,0



(a) Experimentelles ESR-Spektrum von HbNO

(b) Simuliertes HbNO-Spektrum

Abbildung 3.2: Vergleich eines experimentellen mit einem simulierten ESR-Spektrum von HbNO

dies jedoch nicht möglich, da die g -Werte nicht mehr korrekt den Einzelspektren zugeordnet werden können. Eine Trennung der Einzelspektren bei der Messung z. B. durch getrennte Messung der Hämoglobin-Untereinheiten oder durch Aufnahme der axialen Komponente bei Temperaturerhöhung wäre notwendige Voraussetzung. Auch ein verändertes Sättigungsverhalten der Signalkomponenten bei unterschiedlichen Temperaturen könnte der Auftrennung in die Spektrenbestandteile dienen.

Mit den vorliegenden experimentellen ESR-Spektren von HbNO war die Erstellung eines Spektrenkataloges in Abhängigkeit von der HbNO-Konzentration nicht möglich. Da gerade im physiologischen Milieu mit weiteren Einflußfaktoren auf die Signalgestalt gerechnet werden muß, ist die Simulation der ESR-Signale hier nicht vervollständigt worden. Unter Ausnutzung der oben genannten Möglichkeiten bei den ESR-Messungen sollte eine korrekte Simulation der HbNO-Signale jedoch möglich sein. Bei Untersuchungen struktureller Eigenschaften von Hb und HbNO kann damit der Einfluß der Signalbestandteile auf das Gesamtsignal besser erkannt werden.

3.1.2.2 Material und Methoden

Die beschriebenen ESR-Messungen wurden an den folgenden Meßgeräten durchgeführt:

E 4 (Varian Inc.; USA)

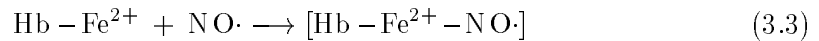
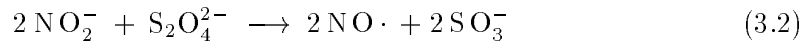
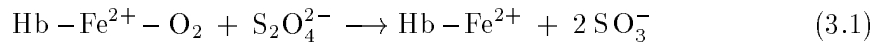
E 3 (Varian Inc.; USA)

ESR-Spektrometer ERS 300 (Zentr. für wiss. Gerätebau der DDR)

An allen Geräten wurde im X-Band-Bereich um 9,2 GHz gemessen. Übliche Einstellungen waren:

Magnetfeld	300 bis 350 mT
Mikrowellenleistung	10 bis 20 mW
Modulationsamplitude	0,1 bis 1 mT
Zeitkonstante/Registrierzeit	3 sec/8 bis 16 min
Meßtemperatur	77 K

Die Herstellung von HbNO-Standardverdünnungen erfolgte durch Inkubation gewaschener Erythrozyten⁴ mit 50 bis 100 mmol/l Natriumdithionit (Na₂S₂O₄)⁵ zur Reduktion von oxyHb (Gleichung 3.1) und zur NO-Bildung aus daraufhin zugesetztem Natriumnitrit (NaNO₂)⁶ (Gleichung 3.2). Die HbNO-Bildung erfolgt dann aus den Produkten der beiden gezeigten Reaktionen deoxyHb und NO (Gleichung 3.3). Die gewünschte HbNO-Konzentration wurde durch die NaNO₂-Konzentration eingestellt. Die Proben wurden in Teflonröhrchen (innerer Durchmesser 3 mm, je 200 µl) überführt, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur Messung bei 77 K gelagert.



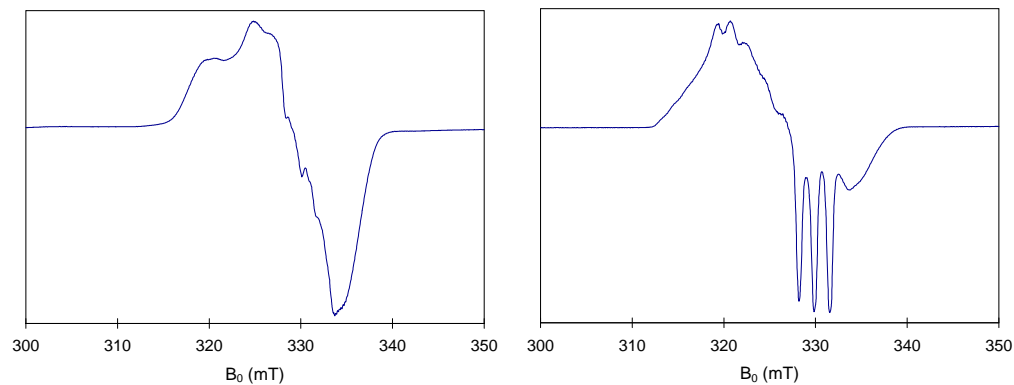
3.1.2.3 Einflüsse auf die HbNO-Signalform

In Abbildung 3.3 sind typische HbNO-Signale dargestellt. Um eine Quantifizierung von HbNO im Patientenblut zu ermöglichen, wurden die Einflüsse auf die ESR-Signalform untersucht, um bei möglichst definierten Meßbedingungen eine Vergleichbarkeit der zu messenden ESR-Signale zu erreichen. Die deutlichste Änderung der dargestellten HbNO-Signale ist die Herausbildung der Aufspaltung im Hochfeldbereich des ESR-Spektrums. Wie schon in Abschnitt 3.1.1 diskutiert, ist hierfür der R-T-Übergang der α-HbNO-Untereinheiten verantwortlich. Untersucht wurden folgende Parameter:

⁴aus Spenderkonserven oder frischem Blut

⁵p. a. Ferak Berlin

⁶p. a. SIGMA chemicals



(a) ESR-Spektrum von HbNO mit geringem α -T-HbNO-Einfluß (7 mmol/l Hb; 50 mmol/l Dithionit; 8 mmol/l NaNO₂; pH-Wert: 7,4)

(b) ESR-Spektrum mit großem α -T-HbNO-Einfluß (7 mmol/l Hb; 50 mmol/l Dithionit; 2 mmol/l NaNO₂; pH-Wert: 6,0)

Abbildung 3.3: Struktur der ESR-Signale von HbNO

pH-Wert: Mit sinkendem pH-Wert wird ein R-T-Übergang hervorgerufen, die α -T-HbNO-Signalfom tritt deutlich in den Vordergrund. Der pH-Einfluß auf die Spektrenform ist sehr stark. Es ist jedoch immer eine Mischform des Spektrums erkennbar, in der auch Teile des R-HbNO-Spektrums bzw. der β -HbNO-Untereinheit erkennbar sind. Das Spektrum Abbildung 3.4 zeigt den Zustand, der weder bei pH-Werterniedrigung noch bei Zusatz allosterischer Effektoren eine weitere Zunahme des α -T-HbNO-Einflusses beobachten läßt.

Der Übergang von HbNO in den „deoxy“-T-Zustand ist ein Äquivalent zum Bohr-Effekt, bei dem es zur Rechtsverschiebung der Sauerstoffdissoziationskurve von Hämoglobin bei pH-Werterniedrigung kommt. Physiologisch findet eine gesteigerte Sauerstoffabgabe in das Gewebe bei Erhöhung der H⁺-Ionenkonzentration bzw. des CO₂-Partialdruckes statt.

Für die ESR-spektroskopische Quantifizierung von HbNO ist die Messung bei identischem pH-Wert notwendig.

Allosterische Effektoren: Der Zusatz allosterischer Effektoren bewirkt eine Verstärkung der α -T-HbNO-Komponente im HbNO-ESR-Signal. Als allosterische Effektoren werden hier solche Substanzen bezeichnet, die durch Veränderung der Hb-Quartärstruktur eine Veränderung der Sauerstoffbindungskapazität zur Folge

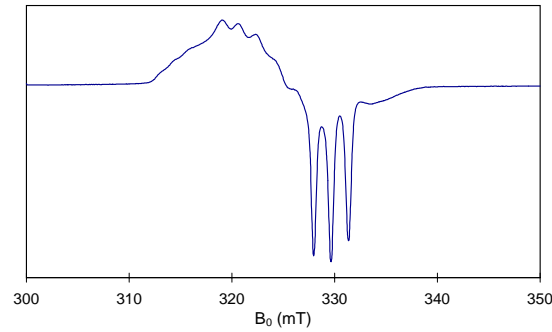


Abbildung 3.4: ESR-Spektrum von HbNO bei einem pH-Wert von 4,3 und nach Zusatz von 70 mmol/l ATP (8 mmol/l Hb; 50 mmol/l Dithionit; 1 mmol/l NaNO_2)

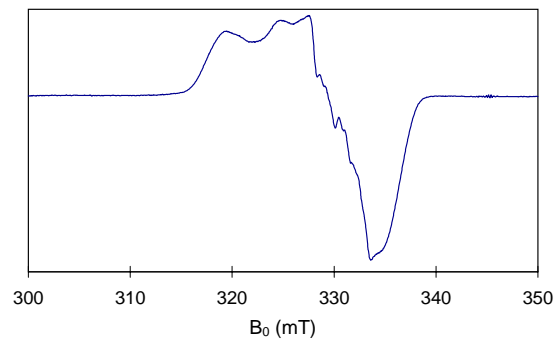
haben. Es wurden folgende anorganische Phosphate untersucht:

A) ATP wurde in 10fachem Überschuß zur Hb-Konzentration zugesetzt, was einer Konzentration von 70 mmol/l entsprach [116]. Die Änderung des HbNO-Spektrums bei einem pH-Wert von 7,4 und zwei Stunden Inkubationszeit ist unter Berücksichtigung des eingesetzten Überschusses an ATP nicht so stark (Abbildung 3.5(b)). Die Auswirkung der pH-Wert-Erniedrigung auf $\text{pH} = 4,3$ bei dieser ATP-Konzentration hat stärkere Auswirkungen auf die Signalform (vergleiche Abbildung 3.4).

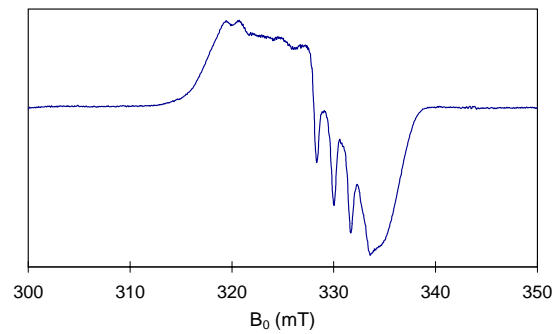
Es ist zu schlußfolgern, daß der ATP-Einfluß bei den Messungen nicht stört, da eine ATP-Gewebekonzentration von 70 mmol/l physiologisch nicht erreicht wird.

B) Inositolhexaphosphat (IHP) wurde in äquimolarem Verhältnis zur Hb-Konzentration zugesetzt, was einer Konzentration von 7 mmol/l entsprach. Der Zusatz von Inositolhexaphosphat hat eine Verstärkung des α -T-HbNO-Anteils im HbNO-ESR-Spektrum zur Folge, die schon bei äquimolarem Verhältnis zum Hämoglobin erkennbar ist (siehe Abbildung 3.5(c)). Durch die sechsfach auftretenden Phosphatgruppe von IHP ist die Wechselwirkung mit den Globingruppen besonders stark [107].

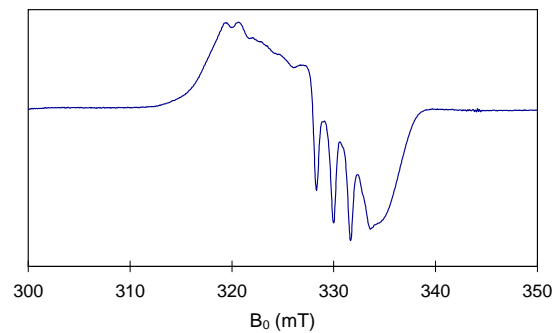
Abhängigkeit der Signalform von der HbNO-Konzentration: Bei der Messung von HbNO-Verdünnungsreihen läßt sich eine Abhängigkeit der Signalform von der NaNO_2 -Konzentration beobachten (siehe Abbildung 3.6(a)). Diese Änderung



(a) HbNO-Spektrum ohne Zusatz allosterischer Effektoren (7 mmol/l Hb; 50 mmol/l Dithionit; 1 mmol/l NaNO₂; pH-Wert: 7,4)



(b) ESR-Spektrum nach Zusatz von 70 mmol/l ATP (7 mmol/l Hb; 50 mmol/l Dithionit; 1 mmol/l NaNO₂; pH-Wert: 7,4)



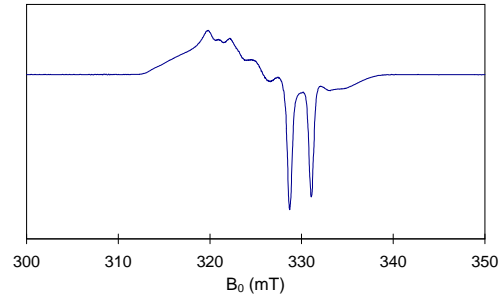
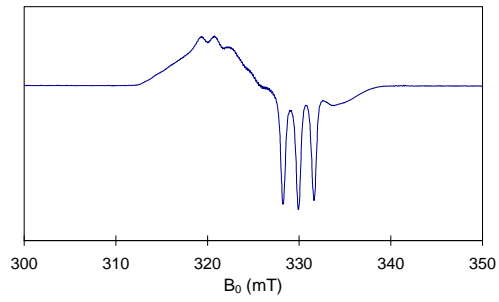
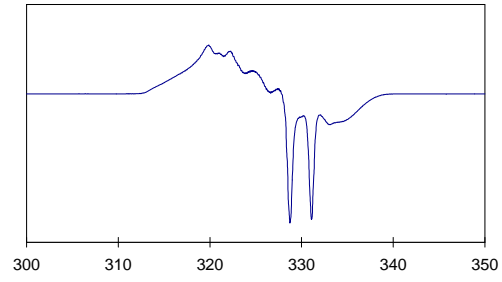
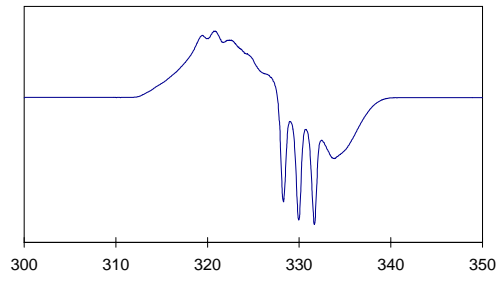
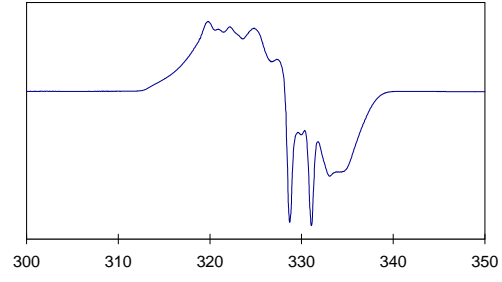
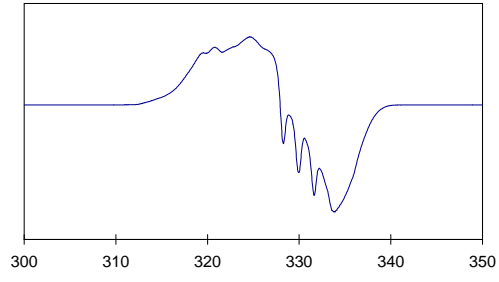
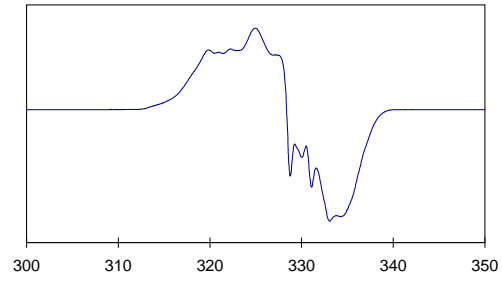
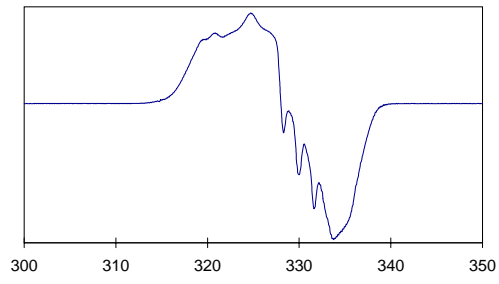
(c) ESR-Spektrum nach Zusatz von 7 mmol/l IHP (7 mmol/l Hb; 50 mmol/l Dithionit; 1 mmol/l NaNO₂; pH-Wert: 7,4)

Abbildung 3.5: Einfluß des Zusatzes allosterischer Effektoren auf die ESR-Signalform von HbNO

läßt sich bei Herstellung von HbNO mit $[^{15}\text{N}]\text{-NaNO}_2$ ⁷ besser erkennen, da bei Kopplung des Elektronenspins mit dem Kernspin von $[^{15}\text{N}]\text{-NO}$ mit $I = \frac{1}{2}$ eine Aufspaltung in zwei Linien im Spektrum von $[^{15}\text{N}]\text{-HbNO}$ zu beobachten ist (siehe Abbildung 3.6(b)). Die Signaländerung zeigt sich bei den vorliegenden Konzentrationsverhältnissen am stärksten zwischen 8 mmol/l und 1 mmol/l der eingesetzten NaNO_2 -Konzentration und zeigt die Zunahme des $\alpha\text{-HbNO}$ -Signalanteils mit sinkender Konzentration des NO-Donors. Unterhalb dieser Konzentration überwiegt in den Standardkurven mit Dithionit-Zusatz das $\alpha\text{-T-HbNO}$ -Spektrum. Die Abhängigkeit der Signalform von der Konzentration des NO-Donors läßt sich auch bei Verwendung von Glyceroltrinitrat als Ausgangsstoff nachweisen. Da die Hämoglobinkonzentration in den Standardlösungen 7 bis 9 mmol/l war, ist es möglich, von einer Primärbesetzung einer $\alpha\text{-Hb}$ -Untereinheit mit NO auszugehen, wie das auch bei der Sauerstoffbindung durch Hämoglobin beobachtet wurde. Damit sind die Signale unterhalb einer bestimmten Konzentrationsgrenze von der Struktur der $\alpha\text{-HbNO}$ -Untereinheiten dominiert. Wird die NO-Konzentration soweit erhöht, daß es zur Doppelbesetzung der Hämoglobin-Untereinheiten kommen müßte, beginnt die Signalkomponente der $\beta\text{-HbNO}$ -Untereinheit die Signalform zu beeinflussen [26]. Allerdings erklärt das noch nicht das ausschließliche Vorliegen der $\alpha\text{-HbNO}$ -Untereinheiten im T-Zustand. Einfluß darauf könnte die hohe Dithionit-Konzentration haben, die eine Deoxygenierung des Hämoglobins und damit die T-Konformation begünstigen könnte.

Der Einfluß der Viskosität auf die ESR-Signalform von HbNO wurde hier nicht näher untersucht, da lediglich bei den Lyophilisationsexperimenten in Abschnitt 3.1.2.6 eine Viskositätsänderung der Proben erfolgte. Weitere in der Literatur beschriebene Einflüsse auf die Signalform sind der Sauerstoffpartialdruck [74], der Hydratisierungsgrad [119] und die Temperatur der Messung [54]. Der Sauerstoffpartialdruck ist ein Parameter, der einerseits die ESR-Signalform von HbNO [74], andererseits aber auch die Bildungswahrscheinlichkeit dieser Verbindung beeinflusst [138], weil bei höherer Sauerstoffkonzentration die Wahrscheinlichkeit der direkten Oxidation von NO zunimmt. Da für die Messungen von Patientenmaterial immer venöses Blut zur Verfügung stand, wurde der Einfluß dieses Parameters auf die Signalform hier nicht untersucht.

⁷p. a. Chemotrade Leipzig



(a) Verdünnungsreihe ^{14}N -HbNO

(b) Verdünnungsreihe ^{15}N -HbNO

Abbildung 3.6: Veränderung der Spektrenform mit der HbNO-Konzentration. Vergleich zwischen ^{14}N - und ^{15}N -HbNO (7 mmol/l Hb, 50 mmol/l Dithionit, eingesetzte NaNO_2 -Konzentration von oben nach unten: 40 mmol/l; 8 mmol/l; 5 mmol/l; 1 mmol/l)

3.1.2.4 Quantitative Messungen

Hintergrund der Überlegungen im vorangegangenen Abschnitt ist die Notwendigkeit, ein Maß für die Quantifizierung der ESR-Signale zu finden. Wegen der unterschiedlichen Anteile der ESR-Teilspektren an den gemessenen ESR-Signalen in verschiedenen strukturellen Zuständen von HbNO ist die Messung der Amplitude oder des zweifachen Integrals⁸ des ESR-Signals zur Quantifizierung der HbNO-Konzentration in der Probe problematisch. Bei der Messung von Standardkurven ist eine ESR-Signalförm-Veränderung in Abhängigkeit von der HbNO-Konzentration zu beobachten. Diese Änderung findet jedoch erst bei Konzentrationen des NO-Donors um 5 mmol/l bei normaler Hb-Konzentration statt. So hohe NO-Konzentrationen werden unter physiologischen Bedingungen nicht erreicht. Hier ist mit Konzentrationen im nano- bis mikromolaren Bereich zu rechnen, in denen keine Änderungen der ESR-Signalförm von HbNO mehr beobachtet wurden. Allerdings tritt dann das Problem der Messung im Bereich der Nachweisgrenze in den Vordergrund. So konnte bei einer Modulationsamplitude von 1 mT noch ein HbNO-Signal bei Einsatz von 1 $\mu\text{mol/l}$ NaNO_2 nachgewiesen werden. Wertet man die Signale nach ihrer Amplitude aus, läßt sich die Linearität der Standardkurve sowohl in einem weiten Konzentrationsbereich (Abbildung 3.7(b)) als auch nahe der Nachweisgrenze (Abbildung 3.7(a)) finden. Hier bewegen sich die Tag-zu-Tag-Variationskoeffizienten der Meßwerte zwischen 10 und 15%.

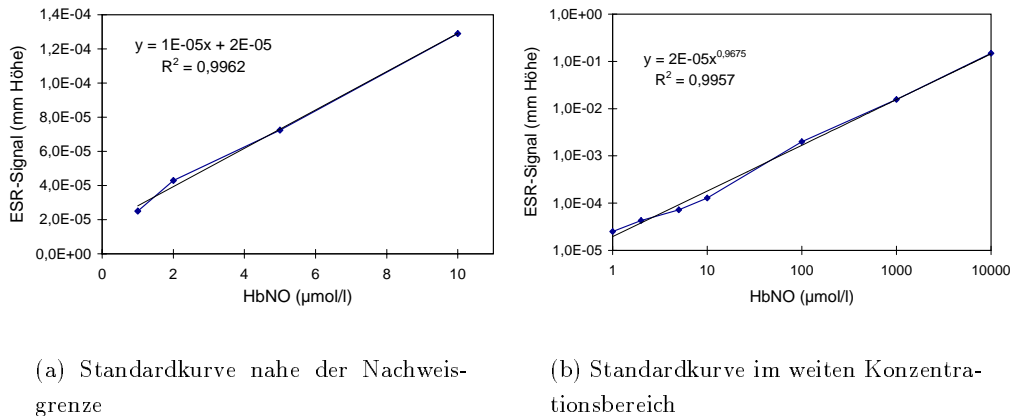


Abbildung 3.7: Standardkurven für HbNO mittels ESR-Messung. Die HbNO-Verdünnungen wurden nach Abschnitt 3.1.2.2 aus NaNO_2 hergestellt dessen Konzentration Grundlage der HbNO-Konzentrationsangaben ist.

⁸Die detektierten ESR-Spektren sind die 1. Ableitung des ESR-Absorptionssignals.

Die gezeigten Standardkurven wurden durch Inkubation von NaNO_2 mit Na-Dithionit (50 mmol/l) in Erythrozytenkonzentrat bei einer Hb-Konzentration von 7 bis 9 mmol/l erhalten. Die Verwendung von anderen NO-Donatoren, wie z. B. Glyceroltrinitrat⁹, S-Nitroso-N-acetylpenicillamin (SNAP)¹⁰ oder Nitroprussid-Natrium ergab andere HbNO-Signalintensitäten als die Verwendung von NaNO_2 . So wird bei Inkubation mit Glyceroltrinitrat, Na-Dithionit und Hämoglobin mehr HbNO gebildet als aus NaNO_2 (Faktor 1,5), während die Ausbeute der Inkubation mit SNAP geringer ist. Da Glyceroltrinitrat drei potentielle NO-Gruppen enthält, ist die größere Ausbeute erklärbar. Es bleibt jedoch festzustellen, daß für die korrekte Konzentrationsbestimmung von HbNO eine Standardkurve verwendet werden muß, die unabhängig von der Ausbeute der chemischen Reaktionen ist, die zur NO-Freisetzung führen. So wäre die Herstellung aus deoxygeniertem Erythrozytenhämolyat durch genaue Zugabe einer NO-Gasverdünnung mittels einer gasdichten Spritze eine durchführbare Variante. Die Deoxygenierung wäre durch Edelgasspülung in einem Laue-Tonometer zu erreichen. Aber auch in diesem Fall wird die Simulation der physiologischen Situation nicht ermöglicht, in der ein bestimmter Sauerstoffpartialdruck die Bildung einer entsprechenden Menge HbNO aus dem NO, das in das Blut übertritt, nach sich zieht.

3.1.2.5 Nachweis von HbNO in humanen Blutproben

Im Blut von Normalpatienten, die nicht mit NO-freisetzenden Pharmaka behandelt werden, ist kein HbNO nachweisbar. Lediglich nach Reduktion mit Dithionit konnte in einigen Fällen ein ESR-Signal gefunden werden, das auf eine HbNO-Bildung aus Nahrungsnitrit im Blut zurückführbar ist. Die basal freigesetzte NO-Menge aus dem Blutgefäßendothel konnte nicht als HbNO im Blut nachgewiesen werden, da die Nachweisgrenze von $1 \mu\text{mol/l}$ für die HbNO-Quantifizierung limitierend ist. Auch der Nachweis von lokal freigesetztem NO z. B. durch PTCA¹¹ war nicht möglich, da die Verdünnung durch den intensiven Blutfluß in den Koronarien zu hoch ist, um die Nachweisgrenze überschreiten zu können. Im Blut von Patienten, die mit NO-freisetzenden Pharmaka behandelt wurden, konnte nur in einigen Fällen ein HbNO-Signal mittels ESR nachgewiesen werden. Ein Beispiel eines Patienten ist in Abbildung 3.8 dargestellt; der Patient war mit einer Glyceroltrinitrat-Dosis von 6 mg/h behandelt worden.

Der Zusatz von Dithionit zu den Blutproben konnte nicht immer einen Beitrag zur Erhöhung der Signalintensität leisten. Die schnelle Oxidation von NO zu Nitrat,

⁹Nitro-POHL® infus Pohl-Boskamp Hohenlockstedt

¹⁰Alexis corporation

¹¹PTCA: percutane transluminale Coronarangioplastie (Ballondilatation von atherosklerotischen Koronarien)

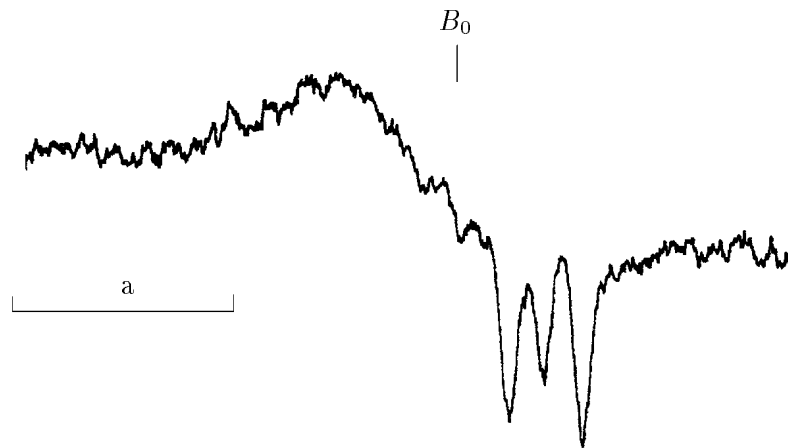


Abbildung 3.8: ESR-Signal der Erythrozyten eines Patienten mit Glyceroltrinitrat-Therapie (Meßbedingungen: $B_0 = 320$ mT, $a = 5$ mT, Mikrowellenleistung: 20 mW, Modulationsamplitude: 1 mT, Zeitkonstante/Registrierzeit: 0,3 sec/8 min, Verstärkung: 5×10^4 Meßtemperatur: 77 K)

das durch Dithionit nicht reduziert wird, verhindert die HbNO-Nachweisbarkeit. Problematisch bei der Verwendung von Dithionit ist die in vitro gezeigte Reduktion von Nitrit und organischen Nitraten unter HbNO-Bildung im Blut. Damit kann nicht mehr eindeutig auf NO als Quelle der HbNO-Bildung geschlossen werden.

3.1.2.6 Konzentrierung der Proben mittels Lyophilisation

Um die Sensitivität des HbNO-Nachweises zu erhöhen, wurde untersucht, ob die Konzentrierung der Blutproben mittels Lyophilisation mit nachfolgender Auflösung in Puffer möglich ist. Hierfür wurden die HbNO-Proben (1 ml Erythrozytenkonzentrat, siehe Abschnitt 3.1.2.2) 3 bis 5 Tage in einer Lyophilisationsanlage¹² bei einem Druck von 0,2 bis 0,8 mbar und einer Temperatur von -20°C bis -10°C getrocknet. Danach wurde das Pulver in $400\ \mu\text{l}$ Phosphatpuffer (pH 7,4) resuspendiert, in Teflonröhrchen überführt und in flüssigem Stickstoff gefroren. Damit wurde ein rechnerischer Konzentrierungsfaktor von 2,5 realisiert.

In Konzentrationsbereichen um 100 bis $1000\ \mu\text{mol/l}$ des NO-Donors konnte eine Intensivierung der ESR-Signale gefunden werden. Bei diesen Konzentrationen war das ESR-Signal von HbNO um den Faktor 1,5 bis 2,1 intensiver, nicht jedoch um

¹²Gefriertrocknungsanlage ALPHA 2-4

den errechneten Faktor von 2,5. Das kann mit der Instabilität von HbNO und einem Freiwerden von NO im Vakuum während der Lyophilisation zusammenhängen. Die Bedingungen bei der Lyophilisation müssen danach absolut vergleichbar sein, um reproduzierbare Ergebnisse zu liefern.

Es konnte außerdem keine Erniedrigung der Nachweisgrenze erreicht werden, da bei Konzentrationen um $10 \mu\text{mol/l}$ des NO-Donors ein anderes ESR-Signal in den Vordergrund trat, das HbNO-Signalreste überdeckte. Durch die Lyophilisation wird eine Spezies mit einem g -Wert bei 2 gebildet, die in unbehandelten Blutproben nicht auftritt. Die ESR-Signale von HbNO, das in Erythrozyten durch Inkubation von $10 \mu\text{mol/l}$ NaNO_2 in Anwesenheit von 50 mmol/l Dithionit gebildet wird, sind in Abbildung 3.9(a) dargestellt (oben – mit Lyophilisierung und Wiederauflösung der Probe; unten – ohne Lyophilisierung). In Abbildung 3.9(b) sind die ESR-Signale von Erythrozytenkonzentraten, die lediglich mit 50 mmol/l Dithionit behandelt wurden mit und ohne Lyophilisierung gezeigt.

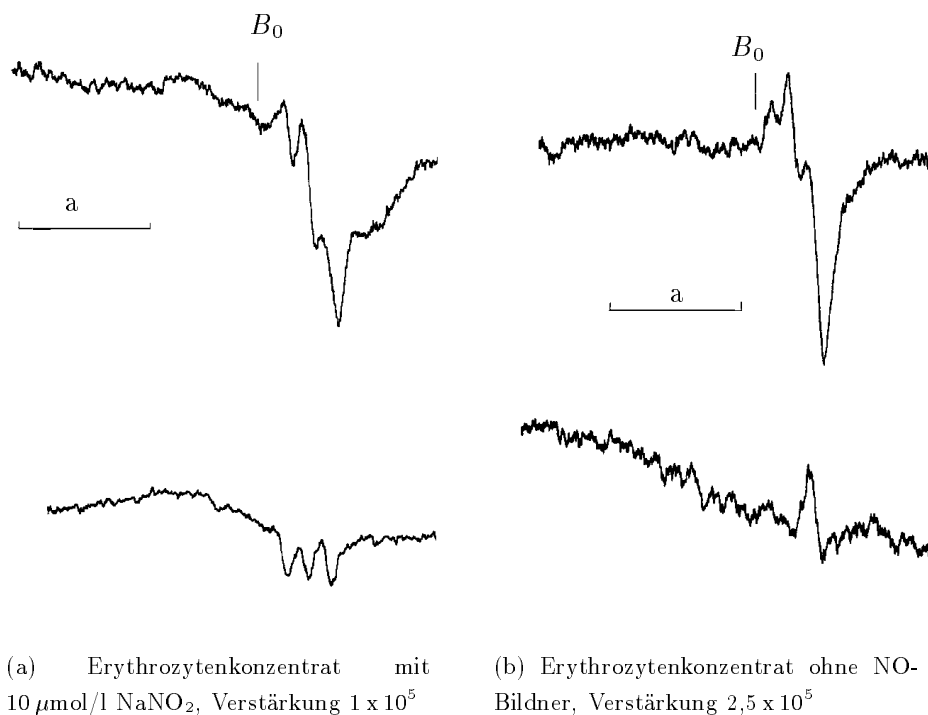


Abbildung 3.9: Vergleich der ESR-Signale bei $g=2$ im Erythrozytenkonzentrat mit (oben) und ohne (unten) vorherige Lyophilisation der Proben. In allen Proben waren 50 mmol/l Dithionit enthalten. ($B_0 = 320 \text{ mT}$, $a = 5 \text{ mT}$)

Da im Bereich des g -Wertes von 2 die ESR-Signale sehr verschiedener paramagnetischer Spezies liegen, ist die Identifizierung des durch die Gefriertrocknung entstandenen Signals ohne weitere Untersuchungen schwierig. Es ist möglich, dieses Signal Hämichromen zuzuordnen, da die Hyperfeinstruktur sehr ähnlich ist und auch eine Signalsättigung bei 5 mW gefunden wurde, die mit den Literaturangaben übereinstimmt [113]. Hämichrome sind irreversibel veränderte low-spin-MetHb-Spezies.

Diese Untersuchungen zeigen, daß durch die Lyophilisierung der Proben keine effektive Senkung der Nachweisgrenze erreicht werden kann und daß stattdessen Nachteile bezüglich der Reproduzierbarkeit der Probenvorbereitung auftreten.

3.1.2.7 Zusammenfassung

Für Fragestellungen bezüglich der Aktivität der NO-Synthasen im menschlichen Organismus ist der HbNO-Nachweis im Blut nicht einsetzbar, da zu geringe Konzentrationen dieser Verbindung auftreten und die Nachweisgrenze der Methode dafür zu hoch ist. Es reagiert nur ein begrenzter Anteil des gebildeten NO mit Hämoglobin, da einerseits nur ein Teil das Gefäßlumen erreicht und andererseits die Oxidation von NO mit der HbNO-Bildung im Blut konkurriert.

Trotz des großen Vorteils der ESR-Methode, spezifisch und selektiv HbNO zu erfassen, ergeben sich gerade bei humanen Proben Schwierigkeiten mit der Nachweisbarkeit. Die Quantifizierung der endogen freigesetzten NO-Menge durch die ESR-spektroskopische HbNO-Erfassung ist nicht als Methode für die Durchführung klinischer Studien zu betrachten. Sie kann jedoch als Referenzmethode und zum Nachweis der HbNO-Identität dienen. Die Anwendbarkeit in tierexperimentellen Untersuchungen wird in Abschnitt 3.7 untersucht.

3.2 ESR-spektroskopischer NO-Nachweis unter Nutzung des DETC-Eisen-(II)-Komplexes als NO-Fänger

Das Disulfiram-Monomer Diethyldithiocarbamat (DETC) bildet in biologischem Milieu den diamagnetischen Eisen-Komplex $\text{Fe}^{2+}-(\text{DETC})_2$, der ein effektiver NO-Fänger ist. Reagiert NO mit diesem Komplex, so wird der stabile paramagnetische Mononitrosyl-Komplex $\text{NO-Fe}^{2+}-(\text{DETC})_2$ mit dem in Abbildung 3.10 dargestellten möglichen sterischen Aufbau gebildet [99].

Die axiale Symmetrie des paramagnetischen Zentrums bedingt ein ESR-Signal, das bei einer Temperatur von 77 K mit den Werten $g_{\perp} = 2,035$ und $g_{\parallel} = 2,02$ beschrieben werden kann. Die Kopplung des ungepaarten Elektronenspins mit dem Stick-

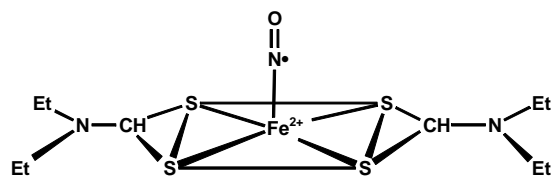


Abbildung 3.10: Sterischer Aufbau des NO-Fe²⁺-(DETC)₂-Komplexes nach [99]

stoffkernmoment von NO hat eine dreifache Hyperfeinaufspaltung des ESR-Signals zur Folge [79, 95, 99]. Für die Nachweisgrenze werden Werte unter 100 nmol/l beschrieben. Da sowohl der Mononitrosyl- als auch der Fe²⁺-(DETC)₂-Komplex lipophil sind, reichern sie sich in den Zellmembranen an. Damit muß für in-vitro-Standardlösungen ein amphiphiles System genutzt werden, da DETC und gelöstes Eisen hydrophil sind. Auch Cu²⁺-Ionen bilden mit DETC einen paramagnetischen Komplex, der wegen $I_{\text{Cu}^{2+}} = 3/2$ eine vierfache Hyperfeinaufspaltung im ESR-Spektrum zeigt. Dieses Cu²⁺-Komplex-Signal überlagert in biologischem Milieu das NO-Fe²⁺-(DETC)₂-Signal. Durch Reduktion von Cu²⁺ zu Cu⁺ mit Dithionit kann dieses Signal eliminiert werden. Außerdem wird eine Umwandlung von diamagnetischen (NO)(NO₂)Fe(DETC)₂-Komplexen in den Mononitrosylkomplex durch die Dithionit-Reduktion beschrieben, die zur Erhöhung der Wiederfindungsrate von NO führt [99].

3.2.1 Material und Methoden

Für die Untersuchung der Einflüsse auf die NO-Quantifizierungsmethode wurde das folgende biphasische System genutzt: Es wurde ein Wasser-Dichlormethan-Gemisch (50 vol%) mit den Substanzen DETC in der Endkonzentration von 2 mmol/l, Eisen-II-sulfat (FeSO₄)¹³ 135 µmol/l, in einigen Experimenten Kupfer-II-sulfat (CuSO₄)¹⁴ 135 µmol/l sowie als NO-Bildner die Substanz GEA 3162 mit 10 µmol/l genutzt¹⁵. Die organische oder wäßrige Phase (200 µl) wurde bei 77 K in Teflonröhrchen eingefroren und mit dem ESR-Spektrometer E 3 (Varian Inc., USA) bei folgenden Einstellungen gemessen:

¹³p. a. Kebo-Lab Schweden

¹⁴p. a. SIGMA chemicals

¹⁵GEA 3162: 1,2,3,4-Oxatriazolium-5-amino-o-3-(3,4-dichlorophenyl)-Chlorid; Alexis corporation

Magnetfeld	300 bis 350 mT
Mikrowellenleistung	10 mW
Modulationsamplitude	1 mT
Zeitkonstante/Registrierzeit	1 sec/8 min
Meßtemperatur	77 K

3.2.2 Ergebnisse und Diskussion

Bei in-vitro-Darstellung des Fe^{2+} -(DETC)₂-Komplexes ist kein ESR-Signal in der organischen Phase zu detektieren, was zu erwarten war. Nach Zusatz des wasserlöslichen spontanen NO-Bildners GEA 3162 wurde in der organischen Phase das in Abbildung 3.11 gezeigte Signal detektierbar, das dem in der Literatur erwähnten NO- Fe^{2+} -(DETC)₂-Signal entspricht [99].

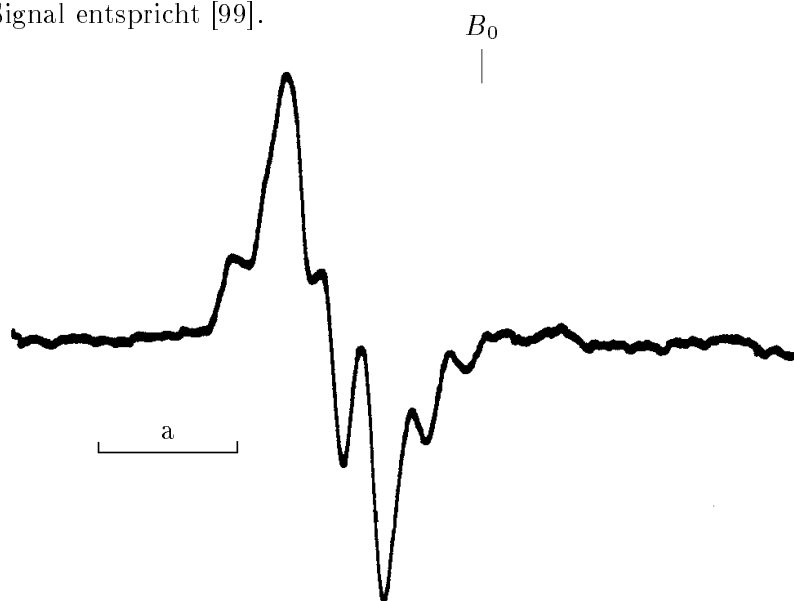


Abbildung 3.11: ESR-Spektrum des NO- Fe^{2+} -(DETC)₂-Komplexes ($B_0 = 330$ mT, $a = 5$ mT)

In der wässrigen Phase war kein ESR-Signal detektierbar. Der Zusatz von Dithionit führte zu einer Signalverstärkung um den Faktor 4. Diese kann auf die Reduktion von Nitrit, das durch den Sauerstoffgehalt der Lösungen gebildet wird, und auf die Umwandlung der diamagnetischen (NO)(NO₂)Fe(DETC)₂-Komplexe in den Mononitrosylkomplex zurückgeführt werden. Außerdem wurde das in Abbildung 3.11 gezeigte Spektrum aus der organischen Phase nun auch in der wässrigen Phase gefunden.

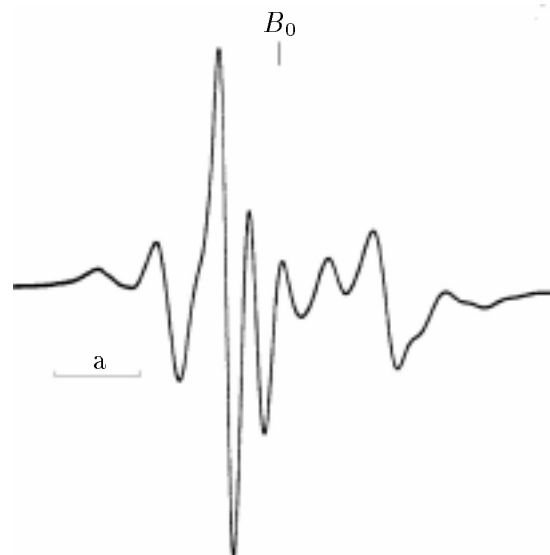


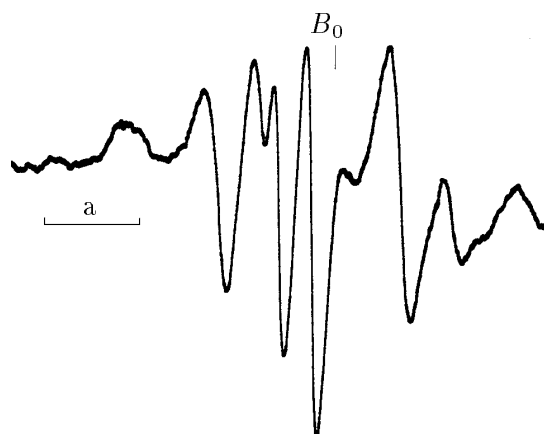
Abbildung 3.12: ESR-Spektrum der gefrorenen Lösung von CuSO_4 ($135 \mu\text{mol/l}$), FeSO_4 ($135 \mu\text{mol/l}$) und DETC (2 mmol/l) in Dichlormethan ohne Zusatz eines NO-Bildners ($B_0 = 330 \text{ mT}$, $a = 5 \text{ mT}$)

Es kommt also zu einer Veränderung des Verteilungsverhaltens des paramagnetischen Komplexes nach Dithionitzugabe. Das ESR-Signal von $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-(DETC)}_2$ in der wäßrigen Phase war 1,5 mal stärker als das in der entsprechenden organischen Phase. Bei der Herstellung von Standardverdünnungen mit Dithionit-Lösungen darf also nicht nur die organische Phase gemessen werden. Auch bei der Verwendung von Hefezellmembranen zur Anreicherung des Komplexes [99] muß bei Zentrifugation und Waschen der Zellen die wäßrige Phase kontrolliert werden.

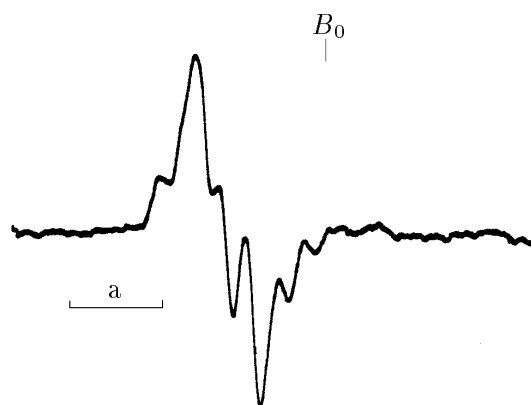
In Gegenwart von Cu^{2+} -Ionen und DETC ist in der organischen Phase das in Abbildung 3.12 gezeigte ESR-Signal zu detektieren.

Um die physiologische Situation zu simulieren, wurde eine Mischung des $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-(DETC)}_2$ -Komplexes und des $\text{Cu}^{2+}\text{-DETC}$ -Komplexes gemessen. Vom $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-(DETC)}_2$ -Signal ist jetzt nur noch die Hochfeldaufspaltung als Schulter am Kupfer-Komplex-Signal erkennbar. Es zeigte sich, daß ein eindeutiges NO-Signal nur bis $10 \mu\text{mol/l}$ des eingesetzten NO-Bildners zu finden war. Bei Konzentrationen, die darunter liegen, überlagert das Kupfersignal das gesuchte Signal zu stark (Abbildung 3.13).

Da der Vorteil der ESR und dieser Trap-Methode in ihrer Spezifität für NO liegt, ist der Einsatz von Dithionit als Reduktionsmittel zur Eliminierung des Cu^{2+} -Signals



(a) NO-Fe²⁺-(DETC)₂-Komplex aus 10 µmol/l GEA 3162 überlagert vom Cu²⁺-DETC-Komplex



(b) NO-Fe²⁺-(DETC)₂-Komplex aus 10 µmol/l GEA 3162

Abbildung 3.13: ESR-Signal des NO-Fe²⁺-(DETC)₂-Komplexes überlagert vom Cu²⁺-DETC-Komplex ($B_0 = 330$ mT, $a = 5$ mT)

kritisch zu bewerten. Durch unspezifische Reduktionen, beispielsweise von Nitrit-Ionen, würde die Ausbeute des NO-Fe²⁺-(DETC)₂-Komplexes fehlerhaft erhöht werden. Notwendig ist die Subtraktion des Kupfersignals von den gemessenen Spektren, wobei hier zur Vermeidung von Artefakten die Kontrolle der Herkunft des NO-Komplex-Signals durch den Einsatz von NO-Synthase-Hemmern in den Experimenten erfolgen muß-

te. Mit den vorhandenen technischen Voraussetzungen war eine Nachweisgrenze von $10\text{ }\mu\text{mol/l}$ erreichbar¹⁶. Dabei muß mit einer unvollständigen Umwandlung des NO-Donors GEA 3162 in den $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-(DETC)}_2$ -Komplex gerechnet werden, da die Oxidation von NO Konkurrenzreaktion ist. Durch Dithionitzugabe kann die Signalintensität erhöht werden, was hauptsächlich auf die Reduktion der entstandenen Nitrit-Ionen zu NO zurückführbar ist. In den folgenden Experimenten war mit den vorhandenen technischen Mitteln lediglich eine Abschätzung der Stärke der NO-Bildung möglich.

3.2.3 Anwendung der Methode im tierexperimentellen Modell

Der Nachweis der endogenen NO-Bildung unter Nutzung des $\text{Fe}^{2+}\text{-(DETC)}_2$ -Komplexes ist eine Methode, die vorwiegend für tierexperimentelle Untersuchungen angewendet werden kann. Für Fragestellungen in Patientenstudien ist sie nicht geeignet, da einerseits eine Infusion von DETC stattfinden müßte und andererseits die Gewinnung ausreichend großer humaner Gewebeproben problematisch ist. Die Nutzbarkeit der Methode wurde in einem Modellversuch an vier Ratten untersucht. Das Ziel war der Vergleich der Nachweisbarkeit des $\text{NO-Fe}^{2+}\text{-(DETC)}_2$ -Komplexes in den verschiedenen Organen nach Stimulation des Immunsystems.

Material und Methoden

Für die Versuche wurden männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 200 g verwendet. Injektionen und Organentnahme erfolgten unter Methohexital-Narkose¹⁷. Für die Stimulation der Immunabwehr wurde Zymosan A aus *Saccharomyces cerevisiae*¹⁸ in isotonischer Kochsalzlösung verwendet, das an insgesamt drei Tagen in einer Dosis von 30 mg je kg je Tag in die Schwanzvene appliziert wurde, wobei nach den ersten zwei aufeinanderfolgenden Tagen ein Tag ausgelassen wurde und die dritte Injektion am vierten Tag erfolgte. Zwei Ratten waren Kontrolltiere ohne Manipulation, zwei Ratten gehörten zur Verumgruppe.

Am fünften Tag wurde die DETC-Injektion durchgeführt. Innerhalb einer halben Stunde wurden 200 mg/kg DETC in isotonischer Kochsalzlösung injiziert.

Die Organentnahme wurde anschließend nach Herzpunktion zur Blutgewinnung durchgeführt. Die Gewebe wurden in einen Zylinder überführt, sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und aus der Umhüllung entfernt. Die so erhaltenen zylinderförmigen

¹⁶Angabe nach eingesetzter GEA-Konzentration

¹⁷60 mg/kg Gewicht; i.p. Brietal®; Lilly

¹⁸SIGMA chemicals

Organstücke mit einem Durchmesser von 3,5 mm und einer Länge von 20 mm wurden am ESR-Spektrometer E 3 (Varian Inc., USA) bei 77 K gemessen.

Ergebnisse und Diskussion

Folgende Organe wurden untersucht: Herz, Leber, Lunge, Milz, Aorta, Skelettmuskel, Niere, Dünndarm, mesenterisches Gefäßbett. Außerdem wurde als Vergleich HbNO in den isolierten Erythrozyten sowie die Plasmanitrat-Konzentration¹⁹ gemessen.

Die HbNO-Konzentration in den Erythrozyten der stimulierten Tiere beträgt 20 $\mu\text{mol/l}$ bei Vergleich mit der Standardkurve des Abschnittes 3.1.2.4, während in den Erythrozyten der Kontrollgruppe ESR-spektrometrisch lediglich der Cu^{2+} -DETC-Komplex nachweisbar ist (vergleiche Abbildung 3.14(a)).

Es wurden Plasmanitrat-Konzentrationen von 100 bis 150 $\mu\text{mol/l}$ bei den stimulierten Tieren und 10 bis 20 $\mu\text{mol/l}$ bei den Ratten der Kontrollgruppe gemessen.

In den folgenden untersuchten Organen war die NO-Bildung bei Aktivierung des Immunsystems durch Zymosan-Injektion nachweisbar: In der *Milz* konnte ein HbNO-Signal in der Zymosan-Gruppe gefunden werden, das etwa 40 $\mu\text{mol/l}$ HbNO entspricht (siehe Abbildung 3.14(c)). Das NO-Fe^{2+} -(DETC)₂-Signal wird hier durch das stärkere HbNO-Signal überdeckt, da der Erythrozytenanteil in der Milz sehr hoch ist.

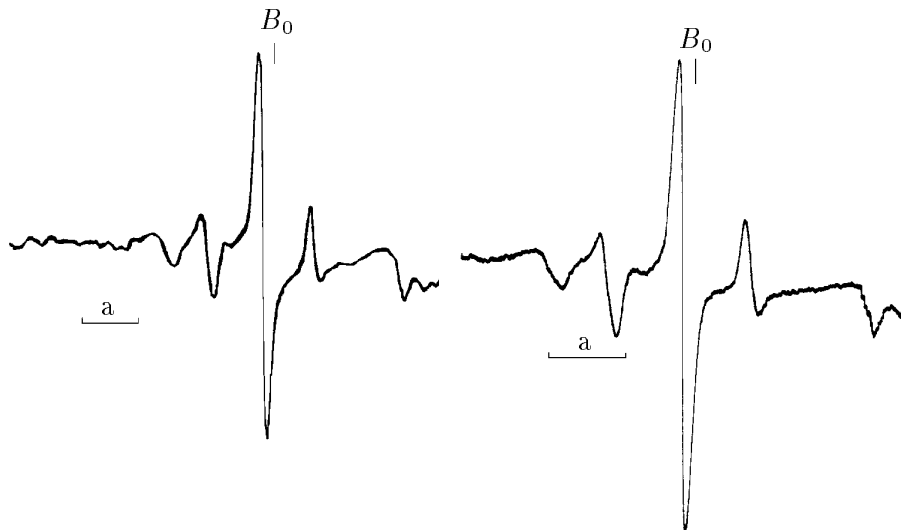
In der *Lunge* (Abbildung 3.14(d)), in der *Leber* sowie im *Herz*gewebe ist der NO-Fe^{2+} -(DETC)₂-Komplex in der Zymosangruppe gut nachweisbar. In der Kontrollgruppe ist in diesen Geweben lediglich der Cu^{2+} -Komplex zu detektieren (Abbildungen 3.14(a) und 3.14(b)).

Im *Dünndarm* ist der Nachweis der NO-Bildung in der Zymosangruppe noch möglich. Unterhalb der Nachweisgrenze ist die NO-Bildung in der *Niere*, im *Skelettmuskel* und im *mesenterischen Gefäßbett*. Hier kann in beiden Tiergruppen nur der Cu^{2+} -Komplex nachgewiesen werden.

Durch die Anwendung des ESR-spektroskopischen NO-Nachweises mittels der Detektion des paramagnetischen NO-Fe^{2+} -(DETC)₂-Komplexes konnte die NO-Bildungsstärke in den einzelnen Organen verglichen werden. Dabei war es möglich, durch die Abschätzung der Signalamplitude Unterschiede der NO-Produktion in den Organen festzustellen. So sind in diesem Modell die Milz und die Lunge die Hauptbildungsorgane von NO, gefolgt von Leber und Herz. Die Methode erlaubte jedoch keine Quantifizierung der NO-Bildung.

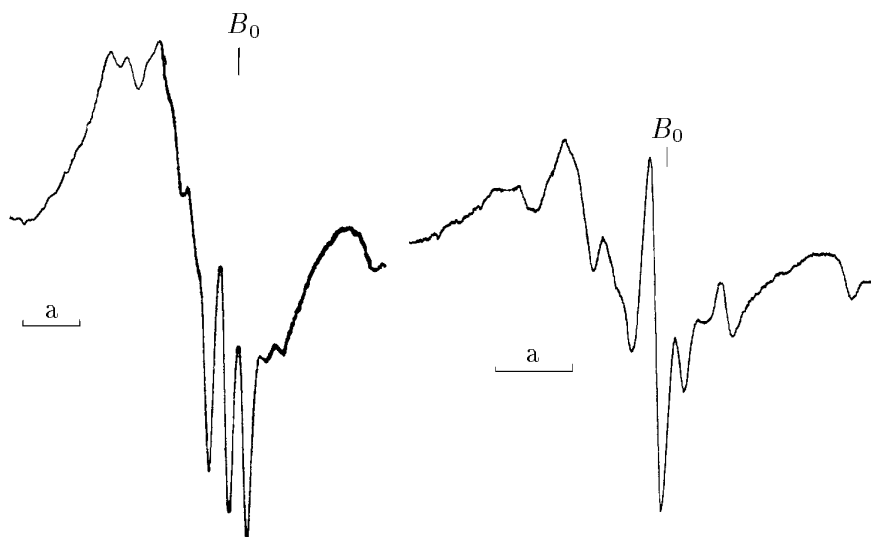
Die gefundenen Abstufungen der NO-Bildung in den Organen sind bei Endotoxin-Stimulierung von Ratten in ähnlicher Weise gefunden worden [19, 118]. In diesen Ar-

¹⁹genutzt wurde die Nitratbestimmungsmethode mittels GC-MS (Abschnitt 3.3.3)



(a) ESR-Spektrum einer Kontroll-Milz

(b) ESR-Spektrum einer Kontroll-Lunge



(c) ESR-Spektrum der Milz einer Ratte mit Zymosan-Stimulation

(d) ESR-Spektrum der Lunge einer Ratte mit Zymosan-Stimulation

Abbildung 3.14: ESR-Spektren von Ratten-Organen nach DETC-Infusion. Auswirkungen der Stimulation des Immunsystems. ($B_0 = 330 \text{ mT}$; $a = 5 \text{ mT}$)

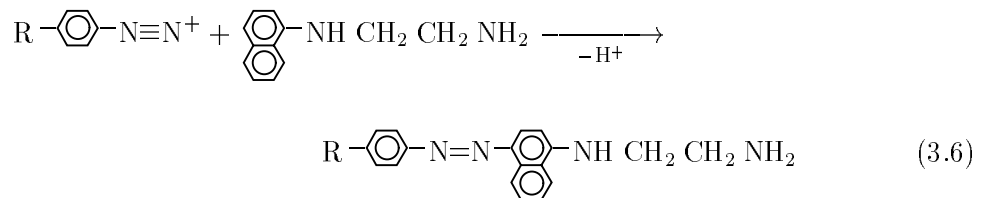
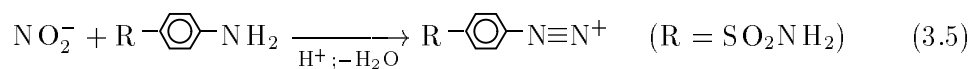
beiten ist die NOS-Expression mittels Immunhistochemie [19] bzw. die NO-Synthase-Aktivität [118] untersucht worden. Durch beide Methoden konnte jedoch in der Niere NOS-Expression und -Aktivität nachgewiesen werden, während hier in vivo keine NO-Bildung gefunden werden konnte. Ursache dieses Unterschiedes könnte die verschiedene Immunstimulierung oder verändertes Verhalten des Enzyms in vivo und in vitro sein.

3.3 Nitrit-/Nitratnachweis

Die Quantifizierung von Nitrit und Nitrat bzw. Nitrat allein ist eine der gebräuchlichsten Methoden, um Informationen über den NO-Stoffwechsel zu gewinnen. Nitrat ist im Blut über Stunden bis Tage stabil [98]. Die Quantifizierungsmethoden sind relativ einfach, sie sind in ihrer Validität und Brauchbarkeit aber auch umstritten. Im folgenden werden drei Methoden bezüglich ihrer Anwendbarkeit in klinischen Studien mit Blutplasma als Probenmaterial untersucht. Dabei soll die Zuverlässigkeit der Methoden und auch der benötigte Zeit- und Materialbedarf betrachtet werden.

3.3.1 Griess-Reaktion

Die Griess-Reaktion ist eine Nachweismethode für Nitrit, die darauf beruht, daß Sulfanilamid im sauren Milieu durch Nitrit diazotiert wird (Gleichung 3.5). Die entstehende Diazo-Verbindung kuppelt in einer elektrophilen Substitution an N-(1-Naphthyl)-ethyldiamin (Gleichung 3.6), wobei es zur Bildung eines roten Azofarbstoffs kommt, der bei einer Wellenlänge von 540 nm ein Absorptionsmaximum besitzt und colorimetrisch erfaßt werden kann.



Nitrat muß vorher zu Nitrit reduziert werden (Gleichung 3.4). Das kann mittels HPLC-Säulen, die mit kupferbeschichtetem Cadmium gefüllt sind, erreicht werden

[20, 39]. Durch Einsatz von Nitratreduktase aus Pilzzellen ist eine erhöhte Spezifität dieser Reaktion erreichbar [33].

3.3.1.1 Material und Methoden

Zur Überprüfung der Anwendbarkeit der Methode wurde Cayman's Nitrate/Nitrite Assay Kit²⁰ verwendet. Dieser Kit ist für Urin- und Plasmaproben ohne Probenvorbereitung sowie für Kulturmedien vorgesehen. Die in der Literatur angewandte Proteinfällung im Plasma kann hier laut Vorschrift²¹ entfallen [18, 33]. Die Umwandlung von Nitrat zu Nitrit erfolgt durch Inkubation mit Nitratreduktase. Die Extinktionsänderung wurde bei 540 nm mittels eines ANTHOS-Plattenreaders²² gemessen.

3.3.1.2 Ergebnisse und Diskussion

Methodenparameter

Es wurde ein gepufferter Nitratstandard für die Ermittlung der Standardkurve verwendet. Der Wert der relativen Standardabweichung eines Plasmapools war nach 15 min Inkubationszeit mit den Diazotierungsreagenzien = 21,3% (n = 10). Nach einer Inkubationszeit von 30 min konnte ein Wert von 6,2% ermittelt werden (n = 10). Empfohlen war eine Inkubationszeit von 10 min. Der Tag-zu-Tag-Variationskoeffizient der Standardkurve lag im Konzentrationsbereich von 5 bis 10 $\mu\text{mol/l}$ bei 10%, bei höheren Konzentrationen zwischen 15 und 35 $\mu\text{mol/l}$ wurden Werte um 5% gefunden. Die Linearität der Standardkurve war bis zu einer Nitratkonzentration von 50 $\mu\text{mol/l}$ gegeben.

Die Wiederfindungsrate wurde durch Verdünnung der Standardkurve mit Blutplasmazusatz ermittelt. In Abbildung 3.15 ist dargestellt, daß die Wiederfindungsrate von Nitrat bei Zusatz von 20% Plasma nur 50 bis 60% beträgt. Dieses Ergebnis läßt bei Bestimmungen im Blutplasma Werte erwarten, die viel zu niedrig liegen.

Der Einfluß unterschiedlicher Plasmaanteile auf die Wiederfindungsrate ist in Abbildung 3.16(a) dargestellt. Mit zunehmendem Plasmaanteil sinkt die Wiederfindungsrate. Die Untersuchung des Einflusses von Albumin als der Haupt-Eiweißfraktion des Plasmas ergab, daß Albumin nicht für den Maskierungseffekt des Plasmas verantwortlich ist (Abbildung 3.16(b)).

Da bei dem angewendeten Kit laut Beschreibung keine Proteinfällung nötig sein sollte, wurden Einflußmöglichkeiten von anderen Blutbestandteilen getestet. Der Cholesterin- und der Bilirubin-Wert hatten keinen Einfluß auf die Meßergebnisse. Das

²⁰Alexis Corporation

²¹Version 2/95

²²Labtec instruments

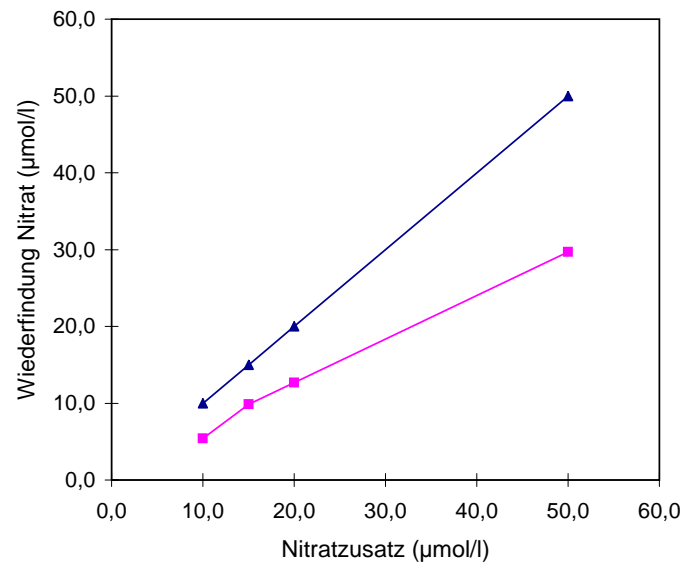
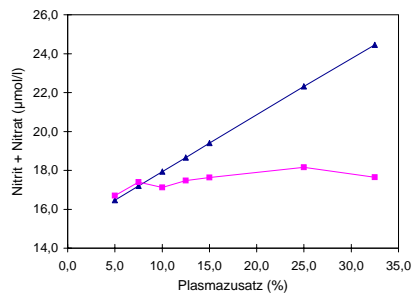
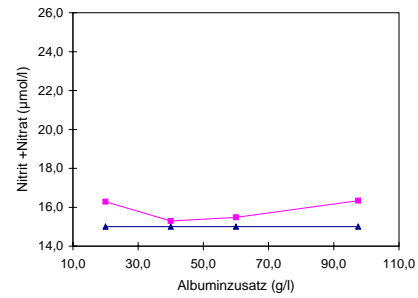


Abbildung 3.15: Wiederfindungsrate von Nitrat im Blutplasma (20% Plasmaanteil)



(a) Wiederfindungsrate bei steigendem Plasmaanteil



(b) Wiederfindungsrate in albuminhaltigem Puffer

Abbildung 3.16: Wiederfindungsrate von Nitrat mittels Griess-Nachweis

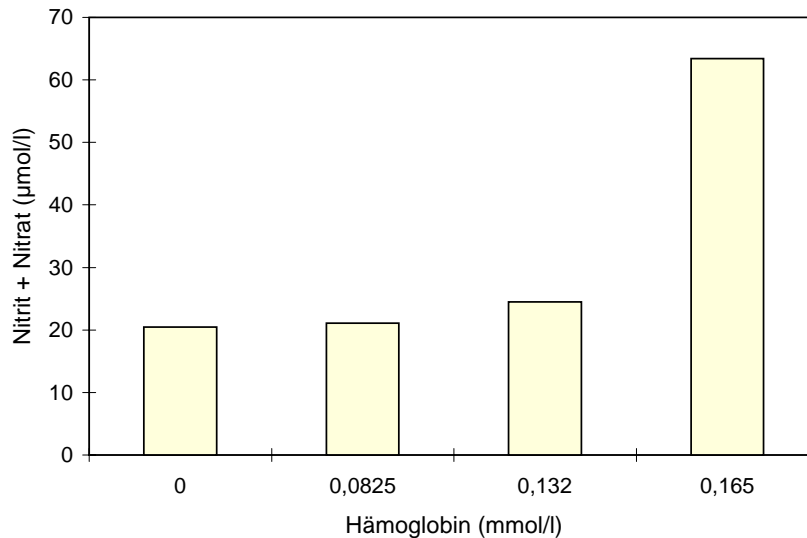


Abbildung 3.17: Einfluß des Hämolysegrades auf die gemessene Nitrit- und Nitrat-Konzentration

Vorliegen lipämischen Plasmas störte die Methode sehr, da die Extinktionen durch Trübungen zu hoch ausfielen. Ein Einfluß des Hämolysegrades des Blutes ist ab Hämoglobinkonzentrationen um 0,1 mmol/l durch erhöhte Extinktionen zu beobachten (Abbildung 3.17). Die Hämoglobin-Absorptionsbanden zwischen 500 und 600 nm, die die Rotfärbung des Blutes hervorrufen, sind die Ursache dieser Interferenz.

Vergleich der Meßergebnisse

Die Ergebnisse der Griess-Methode repräsentieren die Summe von Nitrit und Nitrat im Blutplasma, wenn man keine weitere Differenzierung durchführt. Damit müßten die Werte höher als die der Nitrat-Bestimmung mittels GC-MS liegen (siehe Abschnitt 3.3.3). Der Vergleich der Meßwerte der gleichen Blutplasmaproben ergab aber geringere Konzentrationen bei Anwendung der Griess-Methode (siehe Abbildung 3.18). Über einen weiten Konzentrationsbereich liegen die Werte der Griess-Methode etwa bei der Hälfte der mittels GC-MS erhaltenen Ergebnisse (Konzentrationsbereich 20 bis 300 µmol/l Nitrat, n = 22). Damit wurde der Maskierungseffekt durch Blutplasma auch an den realen Proben bestätigt. Diese Abweichung läßt den Schluß zu, daß die Griess-Reaktion für Blutplasma keine geeignete Nitrit- bzw. Nitrat-Quantifizierungsmethode ist. Schon Gilliam et al. [33] folgerten aus ihren Vergleichsmessungen gegenüber einer Chemilumineszenz-Methode, daß die Anwendung des Griess-Verfahrens nicht für Plas-

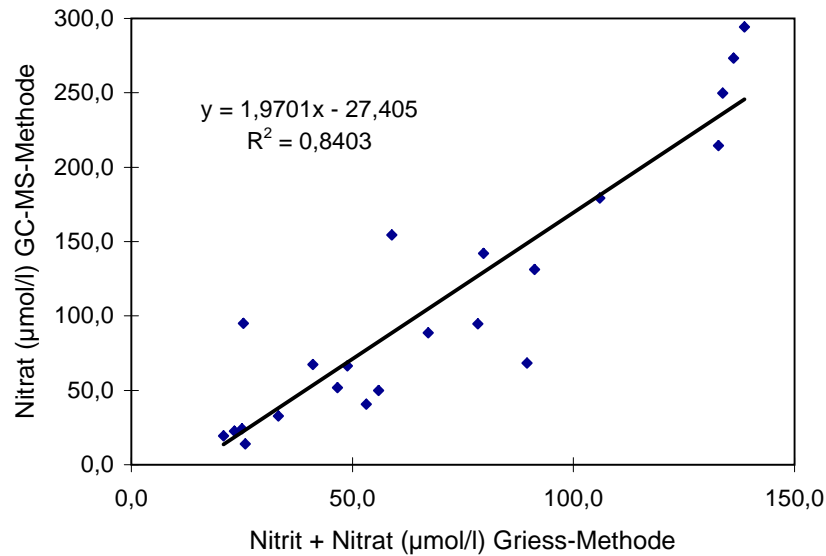


Abbildung 3.18: Vergleich der Ergebnisse der Griess-Methode mit den durch GC-MS ermittelten Plasmanitrat-Konzentrationen

ma oder Serum zulässig ist, da die Ergebnisse auch mit vorheriger Proteinfällung zu niedrig ausfielen. Weil der verwendete Kit jedoch auch für Blutplasma ausgewiesen war, sollte die Wiederfindungsrate in diesem Fall geprüft sein.

Zusammenfassung

Die Ergebnisse zeigen, daß die Methode der Konzentrationsbestimmung von Nitrat und Nitrit nach Griess bezüglich der statistischen Parameter prinzipiell anwendbar ist. Messungen im Plasma sind jedoch nicht möglich, da durch die beschriebenen Maskierungseffekte zu geringe Konzentrationen gemessen werden. Außerdem sind die Störeinflüsse sehr groß und die notwendige Vorauswahl des Materials schränkt die Anwendbarkeit ein. Andere kritische Beurteilungen der Methode beziehen sich hauptsächlich auf die unzureichende Spezifität für Nitrit, so daß beispielsweise N-Nitrosamine oder Nitrosothiole [133] miterfaßt werden. Dabei müßte es jedoch zu falsch erhöhten Meßwerten kommen, die in diesem Fall nicht gefunden wurden.

3.3.2 Quantifizierung von Nitrit/Nitrat mittels Hochleistungs-Flüssigkeitschromatographie (HPLC)

Zur Quantifizierung von Nitrit bzw. Nitrat in biologischen Flüssigkeiten ist auch die Anwendung der Ionenaustausch-Chromatographie möglich.

3.3.2.1 Material und Methoden

An Polymetacrylatsäulen²³ können Nitrit und Nitrat unter isokratischen Bedingungen aufgetrennt und einzeln quantifiziert werden. Die Proben müssen vorher deproteiniert werden, da sonst die Chromatographie-Säule zu schnell an Trennleistung verliert. Dies wurde durch Zugabe eines fünffachen Volumens Acetonitril²⁴ zur Plasmaprobe mit anschließender Zentrifugation erreicht.

Als optimales Laufmittel wurde ein Phosphatpuffer (16 mmol/l, pH 8,5) unter Zusatz von 4% Acetonitril genutzt. Zur Stabilisierung des pH-Wertes wurde der Puffer unter Stickstoffbegasung verwendet.

Mittels eines UV-vis-Detektors²⁵ wurde die Absorption bei 200 nm erfaßt und nach Integration die Fläche unter der Kurve (AUC) als Maß für die Berechnung der Nitrit- bzw. Nitratkonzentration herangezogen. Für die Trennung wurde eine Merck-Hitachi-HPLC-Anlage genutzt²⁶.

3.3.2.2 Methodenparameter

Die relative Standardabweichung der Methode war 8,5% (n=10). Der Tag-zu-Tag-Variationskoeffizient liegt in den Konzentrationsbereichen 1,25 bis 5 $\mu\text{mol/l}$ Nitrat bei 9,5% (n=15), ab 10 $\mu\text{mol/l}$ konnte ein Wert von 5% (n=17) ermittelt werden. Die für HPLC-Systeme relativ hohen Schwankungen sind durch die hohe Störanfälligkeit der Basislinie bei Wellenlängen in der Nähe des UV-Bereiches zu erklären.

Im Gegensatz zur Griess-Methode konnte bei Verdünnung der Standardkurve mit Blutplasma eine Wiederfindungsrate um 100% festgestellt werden. Außerdem ist die Standardkurve in großen Konzentrationsbereichen (2,5 bis 50 $\mu\text{mol/l}$) linear, was eine Verdünnung der Proben zusätzlich zur Proteinfällung unnötig macht. Das Chromatogramm eines Nitratstandards ist in Abbildung 3.19(a) gezeigt.

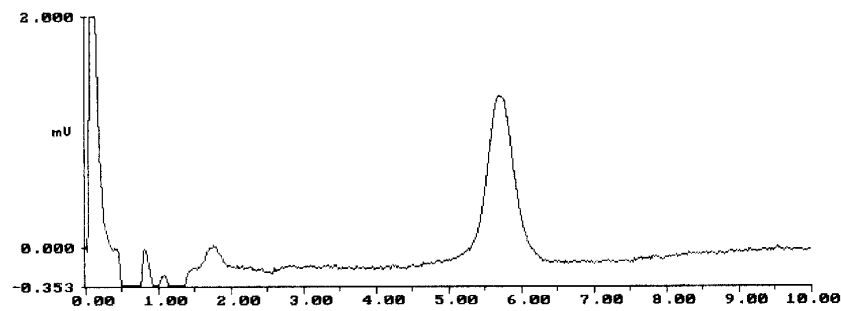
Bei Optimierung der Flußrate ist eine gleichzeitige Quantifizierung von Nitrit und Nitrat möglich. In den folgenden Versuchen wurde bei einer Flußrate von 1 ml/min jedoch keine Trennung des Nitrit-Peaks erreicht. Das maskierende Plasma-Ion bei der

²³IC-Pak A 4,6 x 50 mm Waters/Millipore

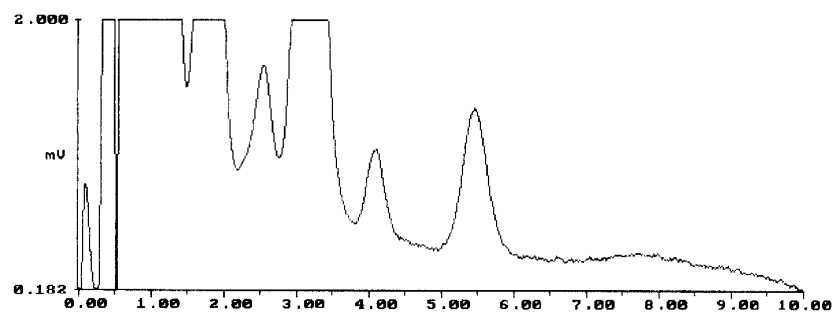
²⁴HPLC grade Merck

²⁵Merck-Hitachi L 4250 UV-vis-Detektor

²⁶Merck-Hitachi L 6200 HPLC-Pumpe, Auswertung mittels D 6000 HPLC-Manager (Merck-Hitachi)



(a) Chromatogramm eines Nitratstandards ($12,5 \mu\text{mol/l}$)



(b) Chromatogramm einer Plasma-Anionentrennung

Abbildung 3.19: Chromatogramme der Anionentrennung mittels HPLC; Retentionszeit von Nitrit: 3 min (maskierter Peak); Retentionszeit von Nitrat: ca. 6 min (Abszisse - Zeit in min)

Retentionszeit von 3 min ist wahrscheinlich Chlorid (siehe Abbildung 3.19(b)). Die Retentionszeit von Nitrat liegt bei den beschriebenen Bedingungen bei 6 min. Damit sind für eine vollständige Nitratanalyse mit Säulenspülung 10 bis 15 Minuten nötig, so daß am Tag nur etwa 30 Proben einschließlich der Standardkurve analysiert werden können.

3.3.2.3 Einfluß der Ernährung auf den basalen Plasmanitratspiegel

Wie bereits aufgeführt, ist der Plasma-Nitratspiegel nicht nur auf den endogenen NO-Stoffwechsel zurückzuführen. Einen großen Einfluß auf die Basalkonzentration hat die Ernährung. Die Therapie mit NO-freisetzenden Pharmaka trägt dagegen wesentlich

weniger zur Nitratkonzentration im Blut bei. Das kann daran gezeigt werden, daß selbst bei der intravenösen Behandlung eines Patienten der in Kapitel 4 beschriebenen Studie mit Glyceroltrinitrat²⁷ (0,85 µg/kg/min) keine Erhöhung der Nitratkonzentration im Blutplasma gegenüber dem behandlungsfreien Vortag detektiert werden konnte.

Der Einfluß der Ernährung auf die Nitratkonzentration im Plasma wird an Probanden gezeigt, die sich drei Tage mit nitrit- und nitratarmer bzw. mit nitrit- und nitratreicher Kost ernährten. Da sich die HPLC-Bestimmungsmethode zur Quantifizierung von Nitrat im Blutplasma als zuverlässig erwiesen hat, wurde dieses Verfahren genutzt. Das Diätregime der Probanden ist in Tabelle 3.2 aufgeführt. Die Plasma-Nitratkonzentration wurde vor Beginn der Diäten, nach Beendigung der dreitägigen nitrit- und nitratarmer Diät und zweimal nach der nitrit- und nitratreichen Mahlzeit im Abstand von einer und zwei Stunden durchgeführt.

Tabelle 3.2: Einteilung von Lebensmitteln nach ihrem Gehalt an Nitrit bzw. Nitrat

Lebensmittel mit geringem Nitrit- und Nitratgehalt	Lebensmittel mit hohem Nitrit- und Nitratgehalt
Fisch und Fleisch: frische unbehandelte Produkte, möglichst weiße Sorten	Gemüse aller Art, auch Kartoffeln und andere Wurzelgemüse
Milchprodukte: Joghurt, Quark, Sahne, Butter, Eis	Verarbeitete Fleisch- und Fischprodukte (besonders Geräuchertes)
Körner und Brot, Nudeln, Reis, Eier, Früchte, Süßigkeiten	Käse, Kräutergewürze, Ketchup, Chips und dergleichen
Getränke: Obstsäfte, Milch, Kaffee und Tee mit nitritarmen Wasser zubereitet	Getränke: Mineralwasser, Gemüsesäfte

In Abbildung 3.20 sind die Ergebnisse der Untersuchung dargestellt. Schon sehr schnell nach Aufnahme von nitrit-/nitratreicher Nahrung ist die Erhöhung der Nitratkonzentration im Blutplasma zu finden. Dabei kommt es zu einer Verfünffachung der Werte nach dreitägiger nitrit-/nitratarmer Diät von 19,5 µmol/l auf 104,5 µmol/l nach nitrit-/nitratreicher Diät innerhalb von einer Stunde. Die für normale Durchschnittsernährung relativ niedrige Plasma-Nitratkonzentration von 29,5 µmol/l vor der nitrit-/nitratreduzierten Diät ist durch die erste Probennahme vor der Mittags-

²⁷Trinitrosan®

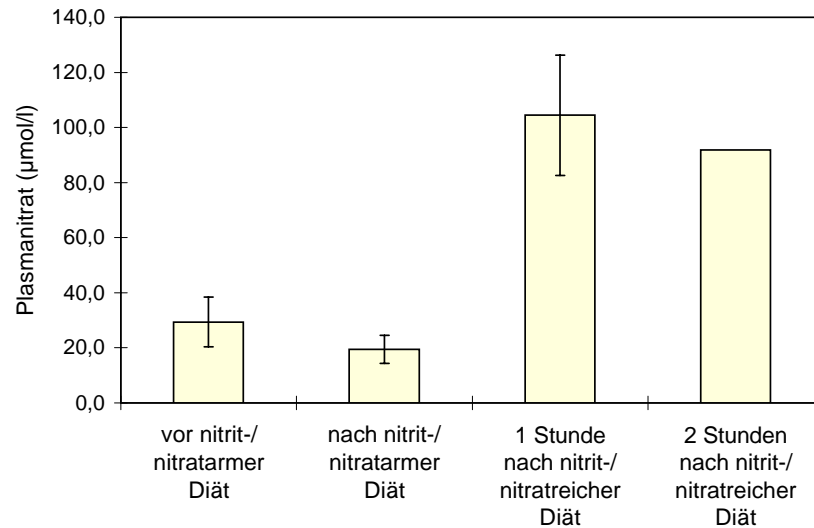


Abbildung 3.20: Einfluß der Nahrung auf die Plasma-Nitratkonzentration ($\pm s$)

mahlzeit erklärbar. Es kann damit auch gezeigt werden, daß die Halbwertszeit im Blutplasma relativ kurz ist. Sie wird mit acht Stunden angegeben²⁸.

Es wurde gezeigt, daß der Einfluß der Ernährung auf den Plasma-Nitratspiegel sehr groß ist und kurzfristigen Schwankungen unterliegt. Das bedeutet, daß Patienten, die in Studien mit Untersuchung des NO-Stoffwechsels einbezogen werden, unbedingt eine nitrit- und nitratreduzierte Diät zu erhalten haben. Dabei reicht ein Diätbeginn einen Tag vor der Blutabnahme im Falle von Untersuchungen, die die Rolle von NO im Immunsystem zum Gegenstand haben. Ist eine Studie darauf ausgerichtet, den Einfluß der veränderten NO-Produktion durch die konstitutiven Enzyme zu betrachten, ist eine sehr strenge Diät, die zwei Tage vor der Untersuchung beginnt, einzuhalten. Wegen der im Vergleich zur induzierbaren Isoform geringen NO-Bildung durch die konstitutiven Isoenzyme sind Erhöhungen der Nitratkonzentration im Plasma nur bei sehr geringen Basalkonzentrationen meßbar. Patienten, die NO-freisetzende Pharmaka erhalten, sind für solche Studien nicht geeignet, ebenso wie Raucher, da mit dem Zigarettenrauch hunderte ppm NO je Zug inhaliert werden [44].

²⁸laborinterne Untersuchungen der Arbeitsgruppe von Prof. Wennmalm

3.3.3 Quantifizierung von Nitrat mittels Gaschromatographie-Massenspektrometrie (GC-MS)

Die GC-MS-Quantifizierungsmethode von Nitrat beruht auf der massenspektrometrischen Quantifizierung von Nitrobenzen, das aus Nitrat gebildet und vor der Quantifizierung gaschromatographisch gereinigt wird. Das in der Probe enthaltene Nitrat wird in einer Nitrierungsreaktion zu Nitrobenzen derivatisiert (siehe Gleichungen 3.7 und 3.8). Durch vorherige Zugabe von [¹⁵N]-Nitrat als internen Standard läßt sich dann massenspektrometrisch das Verhältnis von [¹⁴N]-Nitrobenzen, das aus dem endogenen Nitrat entstanden ist, zu [¹⁵N]-Nitrobenzen, das aus dem internen Standard gebildet wurde, bestimmen.



3.3.3.1 Material und Methoden

Probenvorbereitung: Es kann Blutplasma mit Heparin, EDTA oder mit Citrat als Antikoagulant verwendet werden. Weiterhin ist es möglich, die Nitratkonzentration im Urin zu bestimmen. Getestet wurde zudem die Möglichkeit der Messung im Augenkammerwasser. Zu den Proben wird als interner Standard [¹⁵N]-KNO₃ gegeben; die Menge muß der Nitratkonzentration des Probenmaterials angepaßt sein²⁹, um Ergebnisse innerhalb der Standardkurve zu erhalten.

Derivatisierung: Die mit dem internen Standard versetzte Probe wird zu einer Mischung aus 120 µl Trifluormethylsulfonsäure (TFSMA)³⁰ und 750 µl Benzen gegeben, welche vorher mindestens 30 min bei -80°C gekühlt worden war. Es werden 50 µl Plasma bzw. 20 µl Urin verwendet und das Inkubationsgemisch wird 30 min bei Raumtemperatur intensiv geschüttelt. Nach Neutralisierung der organischen Phase mit 0,5 mol/l Na₂CO₃-Lösung wird diese in Autosampler-Gläschen überführt.

Messung mittels GC/MS: Für die Gaschromatographie wird 1 µl der organischen Phase verwendet und durch einen Temperaturgradienten (60 bis 120°C) an einer

²⁹z. B. 1 µg [¹⁵N]-KNO₃ in 100 µl Plasma oder 1 µg [¹⁵N]-KNO₃ in 10 bis 20 µl Urin

³⁰Sigma Chemicals

XTI-5-Kapillarsäule³¹ getrennt (Varian 3400-Gaschromatograph). Nach Überführung in das Massenspektrometer (Varian Saturn) wird die Probe durch chemische Ionisation positiv geladen (Reaktionsgas Methan) und das Peakhöhenverhältnis der Ionen mit m/z 124 (Nitrobenzen-Ion aus endogenem Nitrat) zu m/z 125 (Nitrobenzen-Ion aus internem Standard) bestimmt.

Je Derivatisierungsansatz sollten nicht mehr als 20 Proben verarbeitet werden, wobei eine Stunde je Ansatz einzuplanen ist. Durch parallele Ansätze können am Tag ca. 100 Proben derivatisiert werden. Eine Analyse im GC-MS-Lauf dauert 17 min, so daß bei Messung mit Hilfe eines Autosamplers und Ausnutzung des Gerätes über 24 Stunden ca. 80 Proben meßbar sind.

3.3.3.2 Methodenparameter

Die relative Standardabweichung dieser Methode beträgt 3,9% ($n=10$). Von Tag zu Tag ergibt sich bei niedrigen Konzentrationen (6 bis 15 $\mu\text{mol/l}$) eine relative Standardabweichung von 10% ($n=10$) während ab 25 $\mu\text{mol/l}$ ein Tag-zu-Tag-Variationskoeffizient von 5% ($n=10$) feststellbar war. Die Standardkurve ist im Bereich von 5 bis 160 $\mu\text{mol/l}$ linear, was einem Isotopenverhältnis von 10 bis 100% entspricht (Abbildung 3.21). Weichen die Meßwerte von diesem Bereich ab, muß entweder die Probe verdünnt oder die Menge des zugegebenen internen Standards verändert werden. Es ist eine Nachweisgrenze von 1 $\mu\text{mol/l}$ erreichbar.

Die Zugabe von Plasma zu den Standardverdünnungen ergab geringfügige Maskierungseffekte im überprüften Bereich. Es konnte jedoch keine Abhängigkeit vom Plasmaanteil in den Proben gefunden werden. So kann eine Wiederfindungsrate um 90% zugrunde gelegt werden (Abbildung 3.22).

Die GC-MS-Methode ist ein sehr zuverlässiges Verfahren für die Quantifizierung von Nitrat im Blutplasma. Wegen der weitgehenden Automatisierbarkeit der Methode und der Möglichkeit, derivatisierte Proben ca. eine Woche im gefrorenen Zustand aufzubewahren, ist die Methode in klinischen Studien sehr gut anwendbar.

3.3.3.3 Referenzwerte

Wegen des großen Einflusses der Ernährung auf den basalen Plasma-Nitratspiegel werden in Tabelle 3.3 die Referenzwerte für drei verschiedene Patientengruppen angegeben, die mittels der GC-MS-Methode ermittelt wurden.

³¹Länge 30 m; innerer Durchmesser 0,32 mm (Restek corporation),

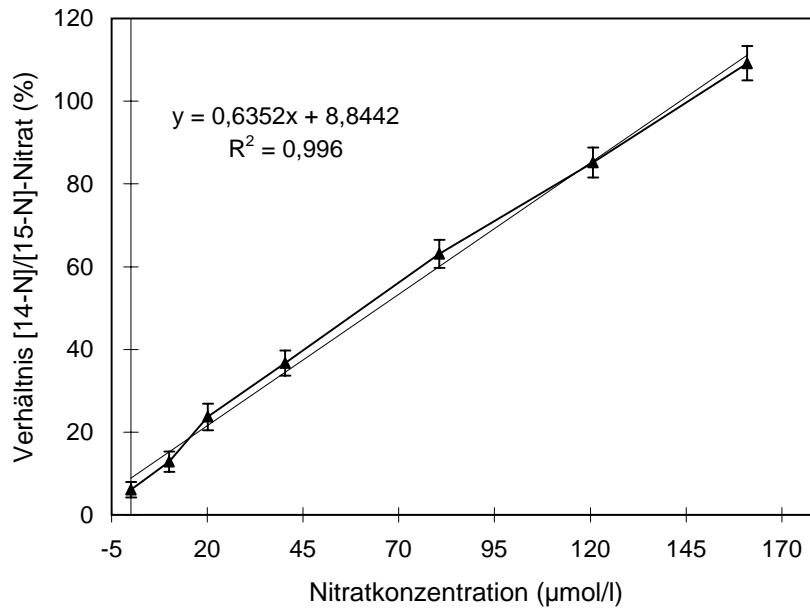


Abbildung 3.21: Standardkurve der Nitratbestimmung mittels GC-MS ($\pm s$). Der Mittelwert aller gemessenen Standardserien ergab die Berechnungsgrundlage für die Werte.

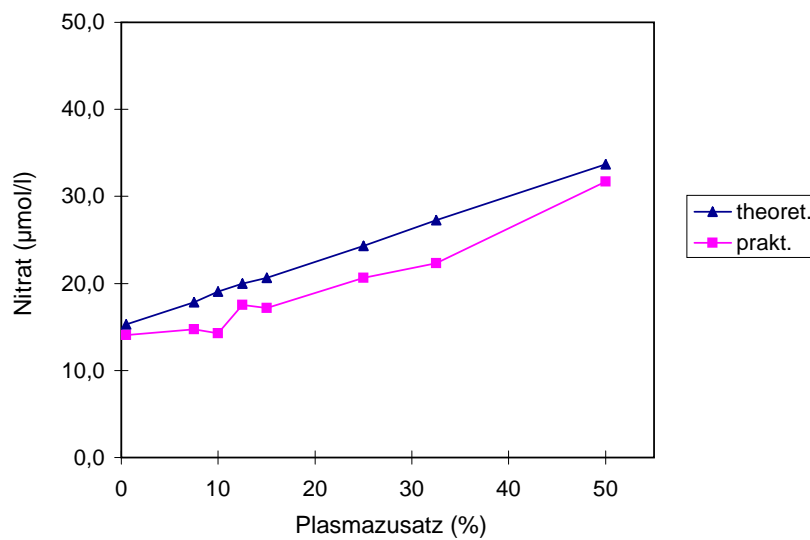


Abbildung 3.22: Wiederfindungsrate von Nitrat bei Plasmazusatz

Tabelle 3.3: Referenzwerte der Nitratkonzentration im Plasma

	Patienten mit durchschnittlicher Ernährung	Patienten mit nitrat-/nitritreduzierter Ernährung	Patienten unter Intensivtherapie
Plasma-Nitratkonzentration (Mittelwert, $\mu\text{mol/l}$)	42,9	23,1	26,0
Spanne ($\mu\text{mol/l}$)	21,05 - 89,3	12,4 - 29,1	13,9 - 45,0
Patientenzahl	16	17	24

3.3.3.4 Bestimmung der Nitratkonzentration im Augenkammerwasser

Die Quantifizierung von Nitrat in sehr geringen Probenvolumina ist ein Problem, das in den meisten Fällen nur durch das Poolen von mehreren Proben gelöst werden kann. Die GC-MS-Methode gestattet es, durch Variation der zugegebenen Menge des internen Standards auch Proben mit sehr geringen Volumina zu analysieren, da hier lediglich das Verhältnis zwischen ^{15}N - NO_3^- und ^{14}N - NO_3^- bestimmt wird und die Intensität des im Massenspektrometer detektierten Signals auch bei geringen Konzentrationen Nitrobenzen in der analysierten Lösung genügend hoch ist. Als ein Beispiel der Analysierbarkeit von geringvolumigen Proben soll hier Augenkammerwasser genutzt werden, um die NO-Produktion im Auge zu quantifizieren.

Viele Untersuchungen intraokularer Entzündungsreaktionen werden am Modell der endotoxininduzierten Uveitis bei Ratten durchgeführt. Der NO-Stoffwechsel ist sowohl an Veränderungen der Hämodynamik und der vaskulären Permeabilität bei dieser zytokinvermittelten Entzündung als auch an der Beeinflussung der Leukozyteneinwanderung beteiligt [132]. Für die Bestimmung der Nitratkonzentration im einzelnen Auge stehen normalerweise Probenmengen von 5 bis 10 μl zur Verfügung.

Material und Methoden

Eine Uveitis wurde bei den untersuchten weiblichen Lewis-Ratten durch intraperitoneale Injektion von 125 μg LPS³² in 0,1 ml steriler isotonischer Kochsalzlösung induziert. Nach 24 Stunden wurden Plasma und Augenkammerwasser gewonnen. Bei 21 Tieren wurde der Zusammenhang zwischen Nitratkonzentration im Plasma und

³²Lipopolysaccharide von *Salmonella typhimurium*; SIGMA chemicals

im Augenkammerwasser untersucht. Davon waren 7 Ratten Kontrolltiere ohne LPS-Injektion.

Durch die vorangehende Bestimmung der Nitratkonzentration im Plasma nach Abschnitt 3.3.3.1 war es möglich, die benötigte Menge internen Standards abzuschätzen, die notwendig ist, um Werte für die Konzentration im Kammerwasser innerhalb der Standardkurve zu erhalten. 5 μl Kammerwasser wurden dann mit 0,05 bis 0,25 μg $[\text{^{15}N}]\text{-NO}_3^-$ versetzt und dieses Gemisch wurde nach 3.3.3.1 derivatisiert. Dabei wurden wegen des geringen Probenvolumens jedoch nur 15 μl TFSMA eingesetzt.

Verhältnis zwischen der Nitratkonzentration im Plasma und im Augenkammerwasser

Es zeigte sich, daß die Bestimmung der Nitratkonzentration mittels der GC-MS-Methode auch in sehr geringen Probenvolumina möglich ist. Die Nitratkonzentrationen der Kontrolltiere lagen im Plasma zwischen 10 und 20 $\mu\text{mol/l}$ und im Augenkammerwasser zwischen 20 und 50 $\mu\text{mol/l}$. Bei den Tieren mit LPS-Injektion konnten etwa zehnfach höhere Werte gemessen werden. In Abbildung 3.23 sind die jeweils zueinander gehörenden Nitratkonzentrationen in Plasma und Kammerwasser gegeneinander aufgetragen. Die Werte im Augenkammerwasser sind um den Faktor 1,5 bis 2,0 höher als die dazugehörigen Plasmakonzentrationen. Wie in Abbildung 3.23 verdeutlicht, besteht ein linearer Zusammenhang zwischen den Nitratkonzentrationen im Plasma und im Augenkammerwasser. Die höheren Nitratkonzentrationen im Augenkammerwasser im Vergleich zur Plasmakonzentration können entweder durch die lokale Uveitis oder

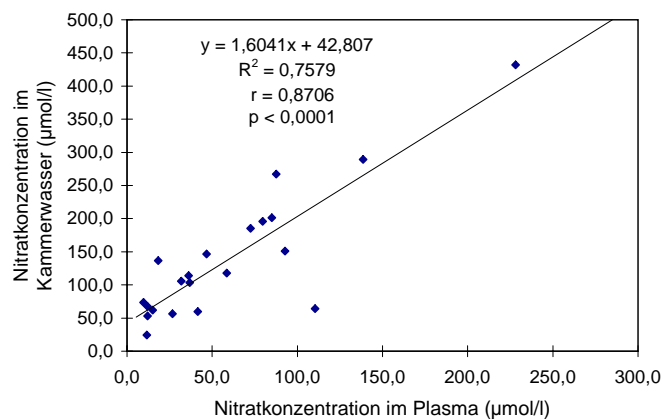


Abbildung 3.23: Vergleich der Nitratkonzentration in Kammerwasser und Plasma von LPS-stimulierten Ratten

durch eine Anreicherung von NO bzw. NO_3^- im Kammerwasser verursacht werden.

Das vorgestellte Verfahren eröffnet die Möglichkeit der Nitratquantifizierung im Kammerwasser eines einzelnen Rattenauges. Auch andere geringvolumige Körperflüssigkeiten können so analysiert werden, wie z. B. Kapillarblut. So sind durch Nutzung dieser Methode Aussagen zu lokalen Verhältnissen der NO-Produktion möglich.

3.3.4 Vergleich der Nitrit-/Nitrat-Quantifizierungsmethoden

Voraussetzung der Quantifizierung von Nitrit und Nitrat bzw. von Nitrat ist eine Vorauswahl des Probenmaterials, da der Einfluß der Nahrung auf die Meßwerte groß ist. So sollten nur Studien geplant werden, in denen eine nitratreduzierte Ernährung eingehalten werden kann. Probanden müssen entsprechend vorbereitet und unterrichtet werden. Patientenmaterial kann nur genutzt werden, wenn ein Überblick über die Ernährung besteht. Bei Tierversuchen ist die Ernährung vorher mitzuplanen. Auch der Einfluß von Medikamenten und Zigarettenrauch ist auszuschließen.

Sind diese Kriterien an das Probenmaterial erfüllt, ist die Analysenmethode zu wählen. Sowohl die Kriterien der statistischen Qualitätskontrolle als auch Möglichkeiten der Anwendbarkeit im Labor sind für die Methodenauswahl von Bedeutung. Von den vorgestellten Nitrit-/Nitrat-Quantifizierungsmethoden ist sowohl die HPLC als auch die GC-MS-Bestimmungsmethode auf der Grundlage der in den vorigen Abschnitten beschriebenen Untersuchungen zu Richtigkeit und Präzision einsetzbar. Die Griess-Methode wird bei Plasmaproben als Analysenmaterial zu Ergebnissen führen, die zu niedrig liegen.

Sowohl für die Nutzung der HPLC als auch der GC-MS müssen gerätetechnische Voraussetzungen erfüllt sein, die nicht in jedem Fall gegeben sind, wobei in selteneren Fällen eine GC-MS-Anlage zur Verfügung stehen dürfte. Trotzdem macht die Abschätzung des Arbeits- und Zeitaufwandes je Analyse deutlich, daß hier die Anwendung der HPLC wesentliche Nachteile aufweist. Es können bis maximal 30 Proben je Arbeitstag inklusive Standardkurve analysiert werden. Da die Proben unmittelbar vor der Analyse vorbereitet werden müssen und die Instabilität dieses Systems Korrekturen erfordert (Basislinienkorrektur), ist mit einer ständig notwendigen Präsenz zu rechnen. Damit ist die HPLC-Methode lediglich für geringe Probenzahlen interessant. Da mittels GC-MS 100 Proben je Tag vorbereitet werden können und diese durch weitgehende Automatisierung gemessen werden, ist diese Methode in größeren Studien vorzuziehen. Die Störanfälligkeit und der laufende Wartungsaufwand sind weit geringer als die der HPLC.

Tabelle 3.4 gibt einen Überblick über die wichtigsten Parameter der untersuchten Nitrat-Quantifizierungsmethoden.

Tabelle 3.4: Vergleich der Nitrat-Quantifizierungsmethoden

	Griess	HPLC	GC-MS
Statistische Qualität Präzision Richtigkeit	hoch in Plasma nicht gegeben	hoch gegeben	hoch gegeben
Gerätetechnischer Aufwand	gering	hoch	sehr hoch
Analysen je Tag	ca. 400	ca. 25	ca. 80
benötigtes Probenvolumen	ca. 40 μ l	10 - 50 μ l	5 μ l
Arbeitsaufwand je Analyse	gering	sehr hoch	gering
Zeit bis Vorlage des Ergebnisses	> 3 Std.	ab 1 Std.	ab 1,5 Std.

3.4 Nachweis von N^ω-Hydroxy-L-arginin im Blutplasma als Maß der NO-Biosynthese

Die Bestimmung der N^ω-Hydroxy-L-arginin-Konzentration ist eine Methode, die spezifisch die Aktivität der NO-Synthasen dokumentiert, weil die einzige Quelle dieser Aminosäure im Organismus der NO-Stoffwechsel ist. Da im Blutplasma bzw. -serum N^ω-Hydroxy-L-arginin mittels HPLC quantifiziert werden kann [46, 92], wurde angestrebt, die Methode als ergänzendes Verfahren zur Nitrat-Ionenquantifizierung heranzuziehen und anzupassen. Der Vorteil liegt in der Unabhängigkeit von externen Einflüssen, wie Ernährung oder Medikamenten.

3.4.1 Material und Methoden

Aminosäureextraktion

Für die effektive Trennung der Aminosäuren im Blutplasma oder -serum mittels HPLC ist es notwendig, die basischen Aminosäuren zu extrahieren. An Kationentauscher-Säulen werden saure und neutrale Aminosäuren entfernt, die die HPLC-Trennung

stören würden. Die Extraktionssäulen³³ wurden folgendermaßen konditioniert: Nach Behandlung mit dreimal 1 ml Methanol wurde mit dreimal 1 ml Wasser gewaschen. Dann wurde die Probe aufgetragen, die vorher mit dem gleichen Volumen Borsäure (500 mmol/l) verdünnt worden war. Die Probe wurde 4 min inkubiert, woraufhin die Säule mit dreimal 1 ml Wasser und zweimal 1 ml Natriumacetat-Lösung (200 mmol/l, pH 4,5) gewaschen wurde. Die Säule wurde dann 4 min im Stickstoffstrom getrocknet und die basischen Aminosäuren wurden mit 1 ml Natriumacetat-Lösung (200 mmol/l, pH 8,5) ausgewaschen. Wegen der geringen Stabilität von N^ω-Hydroxy-L-arginin wurde das Extrakt sofort mit 5 µl o-Phosphorsäure (1,5 mol/l) neutralisiert.

Es ist möglich, durch Einsatz von 0,5 ml Plasma statt der vorgeschlagenen 1,5 ml [92] eine Steigerung der Aminosäure-Ausbeute um mehr als 20% zu erreichen.

Um die Ausbeute des Extraktionsschrittes zu bestimmen, wird ein interner Standard eingesetzt. Bei der von Meyer et al. in [92] vorgeschlagenen Anwendung von [³H]-Lysin³⁴ zeigte sich, daß mit der abweichenden Aminosäurestruktur starke Unterschiede im Extraktionsverhalten verbunden sind, so daß die Nutzung als interner Standard keine zufriedenstellenden Ergebnisse zeigt. Obwohl die Aminosäuren N^ω-Monomethyl-L-arginin (L-NMMA) und N^ω-Dimethyl-L-arginin im Blutplasma basal detektierbar sind, bietet sich deren Nutzung als interner Standard an, da ihre Basalkonzentrationen sehr niedrig und stabil sind (siehe Abschnitt 3.4.3). Nicht nur die strukturelle Ähnlichkeit zu N^ω-Hydroxy-L-arginin, auch die Anwendung der gleichen Quantifizierungsmethode sind neben dem geringeren Sicherheitsrisiko gegenüber dem radioaktiven [³H]-Lysin Vorteile der Verwendung dieser NO-Synthase-Hemmer als interne Standards. Das Verhältnis der Wiederfindungsraten von N^ω-Hydroxy-L-arginin, L-NMMA und [³H]-Lysin ist in Abbildung 3.24 dargestellt. Bei den Plasma-Analysen wurden 20 nmol L-NMMA als interner Standard zum Ausgangsmaterial gegeben.

Aminosäurentrennung mittels HPLC

Durch die strukturelle Ähnlichkeit der extrahierten Aminosäuren ist deren effektive Trennung kompliziert. Die Aminosäuren werden durch Vorsäulenderivatisierung mit o-Phthaldialdehyd fluoreszenzmarkiert³⁵. Die Trennung erfolgte an einer LiChrospher RP 18-Säule³⁶ mit einer Flußrate von 1 ml/min, wobei bei einem Druck von 130 bar gearbeitet wurde. Es wurde eine Merck-Hitachi L 6200 A HPLC-Pumpe verwendet. Der

³³Kationentauscher LiChrolut SCX 200 mg, Merck

³⁴Amersham

³⁵Das Verhältnis von Extrakt zu o-Phthaldialdehyd (SIGMA chemicals) beträgt 4:1, die Markierung erfolgt durch Inkubation von 2 Minuten bei Raumtemperatur.

³⁶Korngröße 5 mm, Länge 125 x 4 mm, Merck

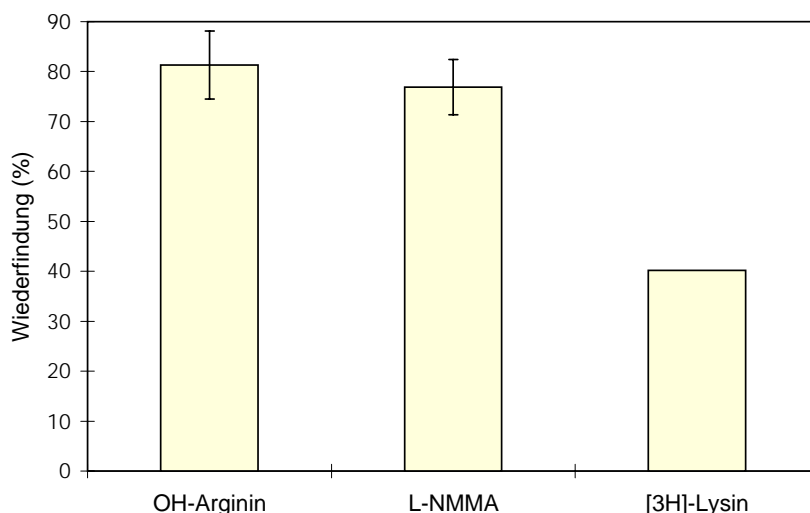


Abbildung 3.24: Wiederfindungsrate verschiedener interner Standards im Vergleich zu N^{ω} -Hydroxy-L-arginin bei Aminosäureextraktion ($\pm s$)

Trennpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 10 mmol/l Phosphatpuffer (pH 5,85), Methanol, Acetonitril, Tetrahydrofuran im Volumenverhältnis 80 : 9,5 : 9,5 : 1. Die Detektion wurde mittels eines Fluoreszenz-Detektors³⁷ durchgeführt (Extinktion 338 nm, Emission 425 nm) und die Peaks wurden durch Integration quantifiziert. Folgende Reihenfolge der Retention wurde beobachtet (siehe Abbildung 3.25(a)):

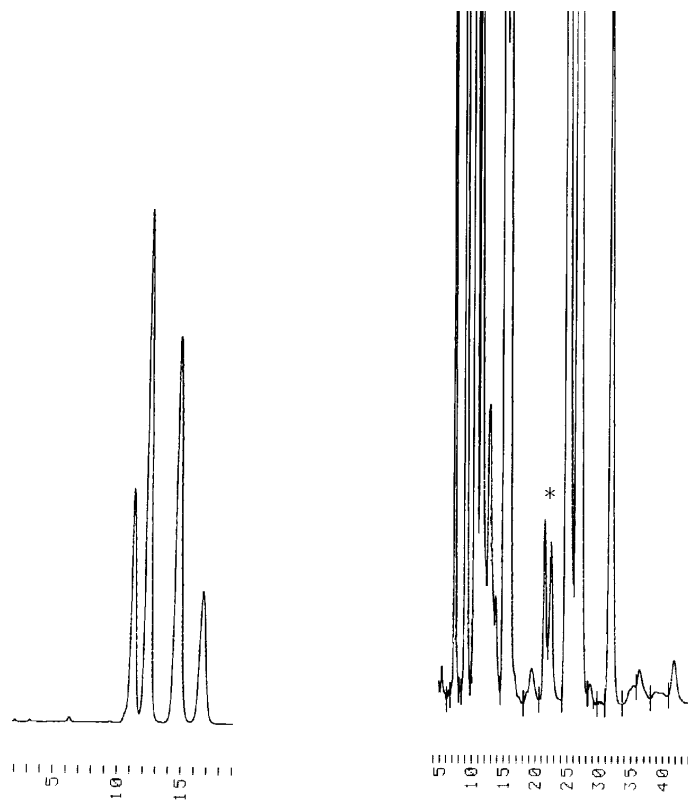
1. N^{ω} -Hydroxy-L-arginin 10 – 11 min
2. L-Arginin 11 – 12 min
3. Monomethylarginin 12 – 13 min
4. Dimethylarginin 14 – 16 min

3.4.2 Methodenparameter

Die relative Standardabweichung der Methode beträgt 7% ($n = 10$). Es ist ein Tag-zu-Tag-Variationskoeffizient der N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Konzentration von 12,4% ($n = 14$) erreichbar.

In seltenen Fällen ist bei externer Zugabe von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin zu humanen Plasmaproben vor der HPLC-Trennung eine Aufspaltung des Peaks zu beobachten (* in Abbildung 3.25(b)), so daß Grund zu der Annahme besteht, daß eine basische Aminosäure im menschlichen Blutplasma auftritt, die keine vollständige Übereinstimmung mit authentischem N^{ω} -Hydroxy-L-arginin zeigt. Auch die Trennung der Proben

³⁷Merck-Hitachi F 1050



(a) Trennung des Standard-Aminosäuregemisches aus Hydroxyarginin, L-Arginin, Monomethylarginin und Dimethylarginin (Trennsäule: LiChrospher RP 18-Säule, Merck)

(b) HPLC-Trennung eines Probandenplasmas mit exogen zugegebenem Hydroxyarginin ohne vorherige Aminosäureextraktion (Trennsäule: Ultratech sphere; HPLC-Technology GB)

Abbildung 3.25: Chromatogramme der Aminosäuretrennung (Abszisse: Retentionszeit in min)

an einer anderen HPLC-Säule³⁸ führt nur sehr selten zu dieser Aufspaltung.

Auf Grund der ansonsten guten HPLC-Trennung der sehr ähnlichen Aminosäuren N^ω-Hydroxy-L-arginin, L-Arginin, N^ω-Monomethyl- und N^ω-Dimethyl-L-arginin muß eine sehr enge Strukturhomologie mit N^ω-Hydroxy-L-arginin vorhanden sein. L-Citrullin ist im extrahierten Plasma nicht wiederfindbar [92]. Die Wahrscheinlichkeit, daß es sich um ein N^ω-Hydroxy-L-arginin-NO-Addukt handelt, ist sehr gering, da dessen Halbwertszeit zu klein ist. Eher möglich ist eine sterische Ungleichheit. Es sollte in diesem Fall also eher von einer „hydroxyarginine like substance“ die Rede sein. Identifizierungsversuche dieser Substanz sind in [85] dargestellt. Es muß hier davon ausgegangen werden, daß das im Plasma quantifizierte N^ω-Hydroxy-L-arginin aus dem NO-Stoffwechsel stammt.

3.4.3 Referenzwerte

Es konnten folgende Referenzwerte der Aminosäurenkonzentration in humanem Blutplasma von 17 gesunden Probanden bestimmt werden ($\mu\text{mol/l} \pm \text{s}$):

N ^ω -Hydroxy-L-arginin	19,4 \pm 1,9
L-Arginin	126,1 \pm 23,1
Monomethylarginin	0,45 \pm 0,13
Dimethylarginin	1,78 \pm 1,33

Untersuchungen zur Aussagekraft des Parameters N^ω-Hydroxy-L-arginin hinsichtlich der NO-Bildung im Organismus werden im Zusammenhang mit der Patientenstudie in Abschnitt 4.3.2 dargestellt.

3.5 Western-Blot-Nachweis der Expression von NO-Synthasen

Die Western-Blot-Methode beruht auf der immunochemischen Detektion von ausgesuchten Proteinen. Voraussetzung ist die Auftrennung eines Proteingemisches mittels denaturierender Elektrophorese (SDS-PAGE³⁹) und der anschließende Transfer der getrennten Proteine aus dem Elektrophorese-Gel auf eine Membran (*Blotting*). Mittels Western-Blot-Analyse läßt sich die Veränderung des NO-Synthase-Gehaltes von Zellen bestimmen, nachdem eine in-vivo- oder in-vitro-Beeinflussung stattgefunden hat. So können Einflüsse auf den Enzymexpressionsmechanismus untersucht werden.

³⁸Ultratech sphere SP 5 ODS, 250 x 4 mm (HPLC-Technology GB)

³⁹SDS-PAGE: *Sodium-Dodecylsulfate Polyacrylamide gel electrophoresis*

3.5.1 Material und Methoden

Probenvorbereitung

Nach Homogenisierung des Gewebes oder der isolierten Zellen im Proteaseinhibitor-Puffer des Abschnittes 3.6.1 werden die Proben zur vollständigen Denaturierung in folgendem Puffer drei bis fünf Minuten im Wasserbad gekocht: 62,5 mmol/l Tris-HCl (pH 6,8); 2,3% SDS⁴⁰ (w/v); 10% (w/v) Glycerol; 5% (v/v) Mercaptoethanol. Zur besseren Handhabung der Proben wird der Puffer mit Bromphenolblau (0,001%) gefärbt.

Proteintrennung

Bei der denaturierenden Gel-Elektrophorese werden alle Proteine durch SDS negativ geladen, wodurch eine ausschließliche Trennung nach Molekülgröße möglich wird. Für die Elektrophorese wurde eine NOVEX-Minigel-Apparatur genutzt. Üblicherweise wurden Polyacrylamid-SDS-Gradienten-Gele⁴¹ 8 bis 16% verwendet. Folgender Laufpuffer kam zur Anwendung: 24 mmol/l Tris-Base; 192 mmol/l Glycin; 0,1% SDS. Bei einer Spannung von 125 V wurde das Proteingemisch getrennt. Je Probenbahn wurden 10 bis 70 µg Protein⁴² aufgetragen.

Transfer auf Membran

Der Transfer aus dem Polyacrylamid-Gel ist notwendig, um eine für die Antikörperreaktion handhabbare Matrix zu erhalten. Die Proteine werden durch die Übertragung auf eine sehr viel dünnere Membran immobilisiert und konzentriert. Als die effektivste Membran hat sich für Proteingrößen um 130 kD eine PVDF-Membran⁴³ wegen ihrer hohen Proteinbindungskapazität erwiesen. Der Transfer wurde mittels Elektroblothing in einer NOVEX-Western-Transfer-Apparatur durchgeführt. Dabei wird ein Verfahren verwendet, das zwischen *Semidry*- und *Tankblotting* steht. Dadurch ist der Transfer auch bei viel geringeren Puffermengen als beim *Tankblotting* sehr effektiv. Der Transferpuffer hatte folgende Zusammensetzung: 12 mmol/l Tris-Base; 96 mmol/l Glycin; 20 vol% Methanol⁴⁴. Bei 0,1 A wurde unter Eiskühlung ein optimaler Proteintransfer in 120 min erreicht. Die Effektivität des Transfers kann durch den Einsatz eines Farb-

⁴⁰Sodium Dodecylsulfate, SIGMA chemicals

⁴¹NOVEX

⁴²Alle Proteinanalysen wurden mit dem Proteinkit D_c-Protein-Assay® (Bio-Rad) ausgeführt.

⁴³PVDF: Polyvinylidendifluorid (Immobilon P, Millipore)

⁴⁴Da die Ionenstärke des Puffers wegen der SDS-Ladung der Proteine wichtiger als sein pH-Wert ist, entfällt die pH-Wert-Angabe.

markers⁴⁵ kontrolliert werden. Da gerade bei großen Proteinen Probleme beim Transfer auftreten können, ist der Farbmaler so nicht nur für die Kontrolle des Endpunktes der Elektrophorese und für die Einordnung der detektierten Proteine von Vorteil.

Detektion der NO-Synthasen

In einem Sandwich-Assay wird das gewünschte Protein detektiert. Dazu wird ein primärer monoklonaler oder polyklonaler Antikörper an eine Antigenuntereinheit (NOS) gebunden. Die hier verwendeten Antikörper⁴⁶ gegen die drei Isoenzyme der NOS zeigen keine Kreuzreaktivität. Der sekundäre Antikörper ist spezifisch gegen den ersten Antikörper gerichtet. Verwendet wurden anti-Maus- oder anti-Kaninchen-Antikörper von TROPIX. Durch die Markierung des sekundären Antikörpers mit alkalischer Phosphatase (AP) ist die Detektion unter Verwendung des AP-Substrates CSPD®⁴⁷ in einer Chemilumineszenzreaktion möglich.

Nach Protokoll wurde die Membran mit den geblotteten Proteinen erst mit einem Block-Caseinpuffer⁴⁸ zur Unterdrückung unspezifischer Bindungen blockiert. Dann wurde über Nacht bei 4°C mit dem primären Antikörper⁴⁹ inkubiert. Nach Waschen der Membran in Blockpuffer wurde mit dem sekundären Antikörper zwei Stunden bei Raumtemperatur inkubiert. Die folgenden Detektionsschritte richteten sich nach Protokoll des Western light Kits, wobei statt der gleichzeitigen Inkubation mit dem Substrat der alkalischen Phosphatase und dem Enhancer⁵⁰ der Reaktion diese Schritte wegen des günstigeren Signal-Rausch-Verhältnisses getrennt wurden. Ein Hyperfilm ECL⁵¹ wurde durch die behandelte Membran 1 bis 10 min belichtet und anschließend entwickelt. Die Lichtemission bei der Phosphatase-Reaktion zeigte sich durch Schwarzfärbung des Filmes. Durch densitometrische Auswertung der belichteten Filme mittels eines EZ-Scanners⁵² war es möglich, die Intensität der Belichtung quantitativ zu erfassen.

⁴⁵Color marker wide range: 6,5 bis 205 kD (SIGMA)

⁴⁶Transduction laboratories

⁴⁷Western light Kit, TROPIX

⁴⁸I-BlockTM TROPIX

⁴⁹iNOS oder ecNOS monoklonaler Antikörper (Verdünnung 1 : 250 in Blockpuffer) bzw. iNOS polyklonaler Antikörper (Verdünnung 1 : 1500)

⁵⁰Nitro-BlockTM; TROPIX; Enhancer werden für eine verlängerte Lichtemission eingesetzt.

⁵¹Amersham lab.

⁵²Helena laboratories

3.5.2 Methodenparameter

Bei der quantitativen Auswertung wurde deutlich, daß der Vergleich unterschiedlicher Blots nur bedingt möglich war. Durch Sättigungseffekte bei der Filmbelichtung ist lediglich der prinzipielle Vergleich der Bandenintensität möglich, nicht jedoch die Quantifizierung der NOS. In Abbildung 3.26(a) ist der Film einer Standardverdünnung gezeigt, in Abbildung 3.26(b) das dazugehörige Densitogramm der Proteinbande mit 100 ng iNOS. Die optische Dichte der Standardverdünnungen ist in der Grafik 3.5.2 im Vergleich zur iNOS-Konzentration aufgetragen.

Voraussetzung einer Quantifizierung der NOS-Konzentration wäre die völlig identische Durchführung aller Schritte der Western-Blot-Analysen, die wegen Mehrfachbenutzung der Antikörper und schlecht standardisierbarer Transfer-Effektivität nicht erreicht wurde. Bei den Analysen wurde jeweils ein NOS-Standard je Gel mitgeführt, um eine Vergleichbarkeit der Blots zu erreichen. Es konnte eine Nachweisgrenze von 10 ng Protein⁵³ gefunden werden.

Mittels Western-Blot-Analyse kann also gezeigt werden, daß unter bestimmten Bedingungen die Enzymexpression gesteigert ist, und bei direktem Vergleich von gleichem Material verschiedener Gruppen sind Rückschlüsse auf die vorhandene Enzymmenge möglich. Wegen der posttranslationalen Steuerungsmechanismen (siehe Abschnitt 2.1.2.2) ist es aber nicht möglich, daraus eine veränderte NO-Produktion abzuleiten.

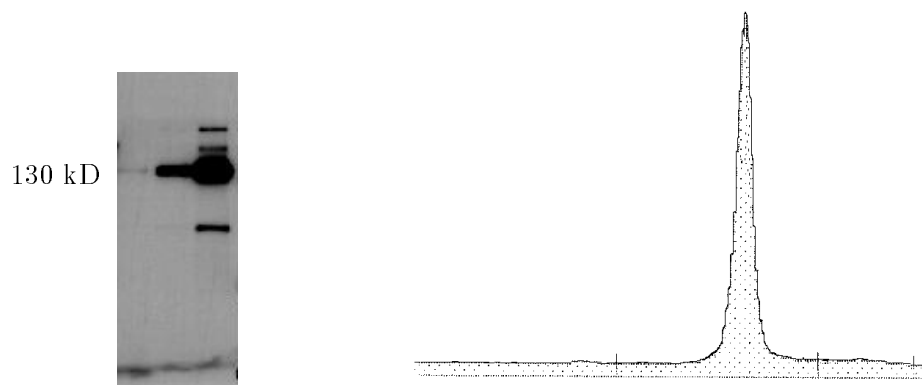
Ein Problem ist, daß zelluläres Material verwendet werden muß. In Patientenstudien ist also die Verwendung von Blutzellen oder Biopsie-Material Voraussetzung.

3.6 Bestimmung der NOS-Aktivität

Beim hier zu diskutierenden Nachweis der NO-Synthase-Aktivität wird die Umwandlung von radioaktiv markiertem [³H]-L-Arginin in [³H]-L-Citrullin, dem Nebenprodukt der NO-Synthese, quantitativ erfaßt [41]. Dabei müssen die beiden Aminosäuren nach Abschluß der Inkubation voneinander getrennt werden, damit das gebildete [³H]-L-Citrullin selektiv mittels β -Counter quantifiziert werden kann. Durch die unterschiedliche Basizität der Aminosäuren⁵⁴ ist diese Trennung durch Kationenaustauscherharze möglich.

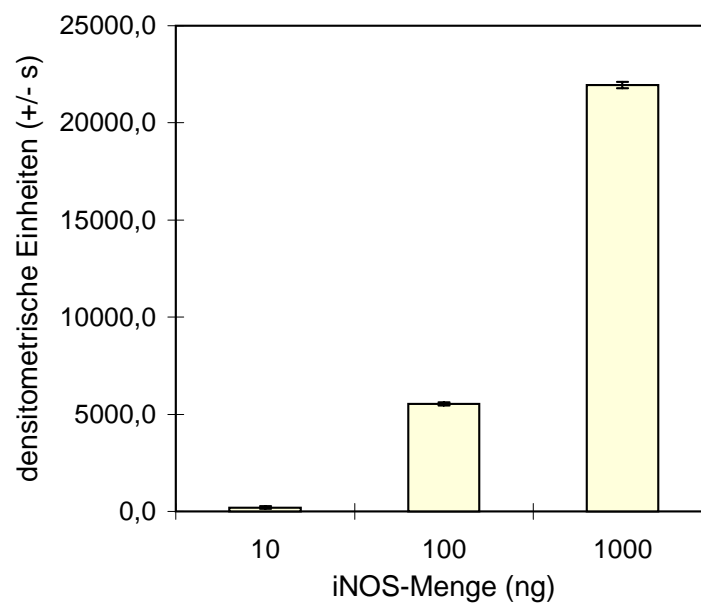
⁵³kommerzielle iNOS von Cayman chemicals

⁵⁴pKa-Werte von L-Arginin: pK_{a1} = 2,18; pK_{a2} = 9,09; pK_{a3} = 13,2
pKa-Werte von L-Citrullin: pK_{a1} = 2,43; pK_{a2} = 9,41



(a) Belichteter Film

(b) Densitogramm der Proteinbahn des gezeigten Films mit der iNOS-Standardverdünnung von 100 ng Protein



(c) Abhängigkeit der optischen Dichte von der eingesetzten iNOS-Menge

Abbildung 3.26: Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen: Standardverdünnung kommerzieller iNOS (eingesetzte Proteinmengen: 10 ng; 100 ng; 1 μ g)

3.6.1 Material und Methoden

Gewebehomogenisierung

Nach Entnahme wurden die Gewebe sofort in flüssigem Stickstoff gefroren und dann bei -70°C gelagert. Für die Gewebehomogenisierung wurde zum Schutz des sehr empfindlichen Enzyms folgender Proteaseinhibitor-Puffer im Masseverhältnis von 1:3 bis 1:7 verwendet: 25 mmol/l HEPES pH 7,4; 0,1 mmol/l EDTA; 0,1 mg/ml PMSF; 0,01 mg/ml Trypsin-Inhibitor; 0,01 mg/ml Leupeptin; 0,01 mg/ml Antipain; 0,01 mg/ml Chymostatin; 0,01 mg/ml Pepstatin. Mit einem Polytron-Gewebehomogenisator wurden die abgewogenen Gewebestücke dreimal 10 sec innerhalb einer Minute im Eisbad homogenisiert und dann 30 min bei $10\,000 \times g$ und 4°C zentrifugiert. Die Überstände wurden vom Sediment getrennt und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Aktivitätsbestimmung

Für die Aktivitätsbestimmung wurden je Probe 0,5 bis 1 mg Protein eingesetzt. In 100 μl des Aktivitätsansatzes waren 5 nmol L-Arginin, 0,5 μCi [^3H]-L-Arginin, 0,3 nmol (6R)-5,6,7,8-Tetrahydrobiopterin (THB), 200 nmol Calciumchlorid, 100 nmol NADPH in 25 mmol/l HEPES-Puffer (pH 7,4) enthalten. Für die Bestimmung der unspezifischen Aktivität wurden zusätzlich 200 nmol L-NAME⁵⁵ verwendet (Leerwert). Die Inkubation bei 37°C wurde nach 30 min durch den Zusatz von 1 ml eiskaltem HEPES-Puffer mit pH 5,5 beendet.

Aminosäuretrennung

Zum Inkubationsansatz wurde 1 ml der 50%igen Kationenaustauscherharz-Aufschwämmung⁵⁶ gegeben, die vorher folgendermaßen präpariert worden war: Für die Überführung der protonierten in die Na^+ -Form wurde 1 Teil des Harzes mit 3 Teilen 1 mmol/l NaOH-Lösung 15 min gemischt. Es wurde mindestens dreimal mit deionisiertem Wasser gewaschen bis der pH-Wert von 7 bis 8 erreicht war. Die 50%ige Kationenaustauscherharz-Aufschwämmung wurde durch den Zusatz von einem Teil 25 mmol/l HEPES pH 7,4 hergestellt. Das Inkubationsansatz-Kationenaustauscher-Gemisch wurde 15 min intensiv geschüttelt.

⁵⁵L-NAME: N^ω-Nitro-L-argininmethylester

⁵⁶Kationenaustauscher-Harz AG 50 W-X 8, 200 – 400, (H^+); BioRad

Erfassung des gebildeten L-Citrullins

Nach Sedimentation des Harzes wurde 1 ml des Überstandes mit 4 ml eines Scintillationscocktails⁵⁷ gemischt und die Zerfälle je min (CPM) mittels β -Counter erfasst. Für die Berechnung wurden nach Subtraktion der unspezifischen Aktivität die CPM des gebildeten [³H]-L-Citrullins prozentual auf die CPM des eingesetzten [³H]-L-Arginins bezogen. Dann wurde auf die Konzentration des eingesetzten L-Arginins umgerechnet, da für die Synthese die Substratfunktion von [³H]-L-Arginin und L-Arginin im gleichen Verhältnis vorausgesetzt wird. Die Ergebnisse wurden durch die Proteinkonzentration korrigiert und werden in pmol gebildetes L-Citrullin je mg Protein je Minute (pmol/mg/min) angegeben.

3.6.2 Methodenparameter

Für den prinzipiellen Nachweis der Nutzbarkeit der Methode wurde aus aktivierten Mausmakrophagen gereinigte iNOS⁵⁸ in verschiedenen Aktivitätsverdünnungen eingesetzt. Abbildung 3.27 zeigt die Linearität der nachweisbaren L-Citrullin-Synthese mit der eingesetzten Enzymaktivität.

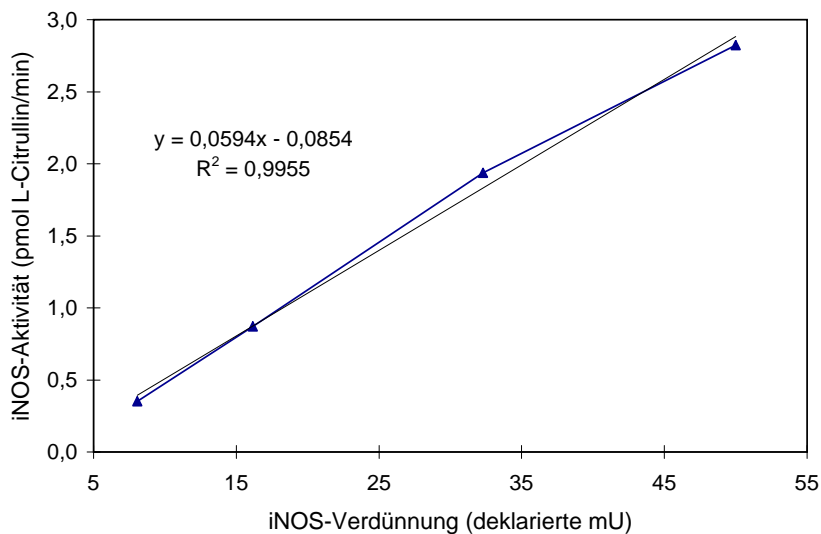


Abbildung 3.27: Verdünnungsreihe iNOS

Die Methode der NOS-Aktivitätsbestimmung ist durch folgende statistische Daten gekennzeichnet: relative Standardabweichung 6,33% (n = 10); Tag-zu-Tag-

⁵⁷Optiphas Hisafe 3; Beckman

⁵⁸Cayman chemicals

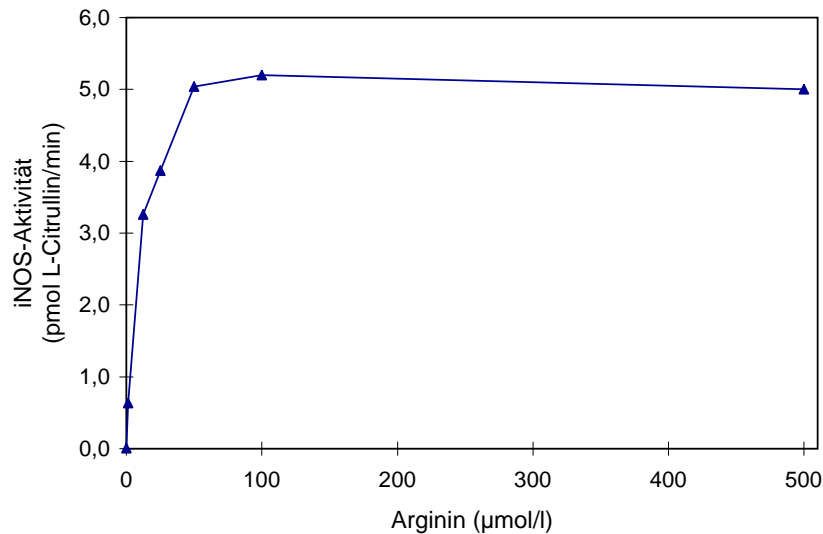


Abbildung 3.28: Abhängigkeit der Enzymaktivität von der Substratkonzentration

Variationskoeffizient 30% ($n=8$). Die Vergleichbarkeit verschiedener Ansätze ist im Gegensatz zu der in der Serie eingeschränkt.

In Abbildung 3.28 wird gezeigt, daß mit $50 \mu\text{mol/l}$ im Bereich der Substrat-Sättigungskonzentration von L-Arginin gearbeitet wurde. Es werden in der Literatur Konzentrationen für den K_m -Wert der NOS angegeben, die zwischen 1 bis $2,3 \mu\text{mol/l}$ liegen [121, 128]. Die für Enzymaktivitätsbestimmungen anzustrebende Substratkonzentration von $10 K_m$ wurde so überschritten. Damit haben Schwankungen der Substratkonzentration z. B. durch endogen im Gewebe enthaltenes L-Arginin keinen Einfluß auf die Enzymaktivität. Das konnte auch dadurch bewiesen werden, daß die gemessene Enzymaktivität in Rattenleber ohne vorherige Substratabtrennung mit den Werten der Lebergewebehomogenate nach Abtrennung des endogenen L-Arginins mittels Kationentauscher korreliert (Abbildung 3.29).

Bei der gereinigten iNOS zeigte sich jedoch eine um 42% niedrigere Aktivität bei der Bindung des Calciums im Inkubationsansatz durch Zugabe von 200 nmol EDTA. Dies widerspricht der Voraussetzung der Ca^{2+} -Unabhängigkeit der Enzymaktivität der induzierbaren NOS-Isoform. In Geweben war diese Hemmbarkeit nicht so stark ausgeprägt (z.B. Jejunum: 25%). Es kann angenommen werden, daß entweder die Basalkonzentration von Calcium im Gewebe höher als in der Enzympräparation ist und deshalb die Ca^{2+} -Schwellenkonzentration für die iNOS hier überschritten wurde oder daß eine Hemmung der Enzymaktivität durch Komplexbildung anderer notwendiger Metallionen durch EDTA stattfindet, die in Gewebehomogenaten in ihrer komplexeren

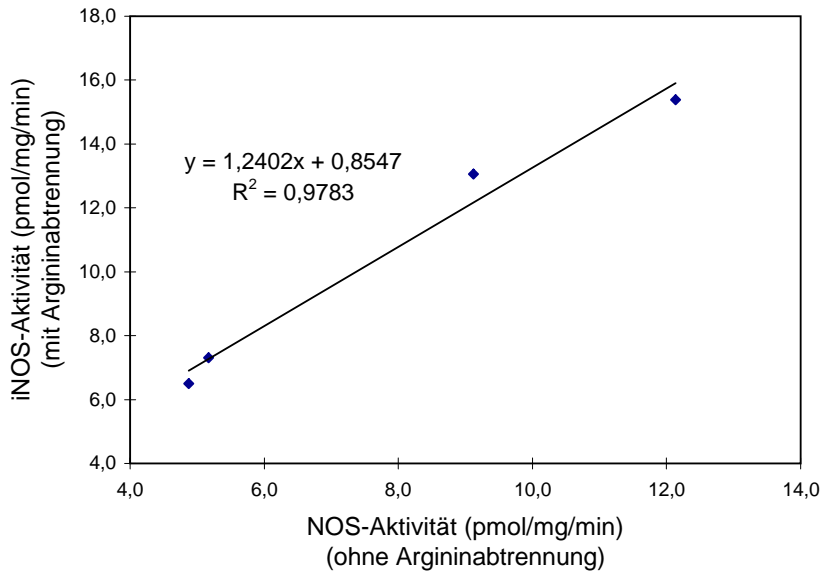


Abbildung 3.29: Vergleich der Enzymaktivität mit oder ohne vorherige Abtrennung des endogenen L-Arginins (Rattenleber)

Zusammensetzung ausgeglichen werden kann. Da trotz Zugabe verschiedener Calcium-Konzentrationen (20 nmol/l bis 2 mmol/l) keine Veränderung der Hemmung der iNOS durch EDTA gefunden werden konnte, ist die zweite Möglichkeit wahrscheinlicher. Eine Abhängigkeit von der Magnesium-Ionenkonzentration konnte ausgeschlossen werden.

Für die Angabe der Ergebnisse wurde der Wert ohne EDTA-Zugabe herangezogen, so daß hier nicht zwischen der Aktivität der konstitutiven und der induzierbaren NO-Synthase unterschieden werden kann und die Ergebnisse die Summe der Aktivität aller NO-Synthasen widerspiegeln. Weiterführende Experimente müßten zeigen, unter welchen Bedingungen eine separate Aktivitätsbestimmung der Isoenzyme erfolgen kann.

Die Prüfung der Effektivität des Kationenaustauschers ist Voraussetzung für eine optimale Trennung des Aminosäuregemisches. Die pH-Abhängigkeit der L-Citrullin-Extraktion ist in Abbildung 3.30 dargestellt. Es zeigte sich, daß Citrullin erst bei einem pH-Wert von über 7,0 aus dem Kationentauschergemisch optimal extrahiert werden kann. Bei einem pH-Wert von 7,4 wurde eine mittlere Extraktionsrate von 104% (Tag-zu-Tag-Variationskoeffizient 8,3%) gefunden. Die durchschnittliche L-Arginin-Extraktionsrate liegt hier bei 3% (Tag-zu-Tag-Variationskoeffizient 6,9%).

Die Überprüfung des pH-Wertes des konditionierten Kationentauscherharzes ist also Voraussetzung der Trennung von L-Arginin und L-Citrullin.

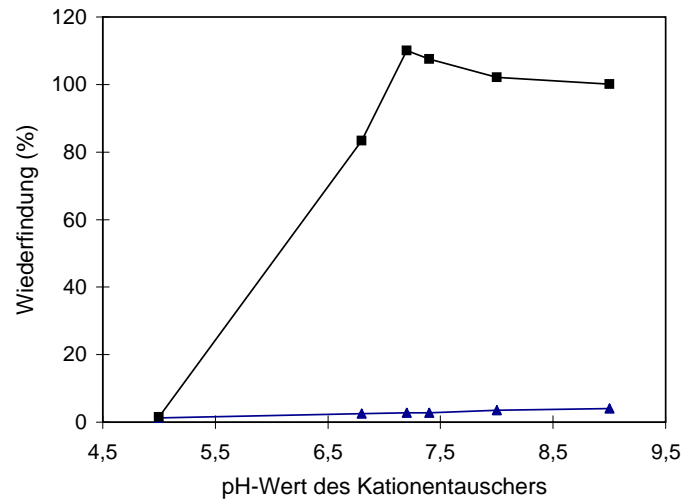


Abbildung 3.30: Abhängigkeit der Extraktionsraten vom pH-Wert des Kationentauschers

In in-vitro-Untersuchungen von Gewebe- oder Zellhomogenaten ist die Summe der Aktivität der NO-Synthasen bestimmbar, was Schlußfolgerungen bezüglich der prätranslationalen Regulationsmechanismen der NO-Synthasen zuläßt.

3.7 Vergleich von NO-Quantifizierungsmethoden am Modell immunstimulierter Ratten

Die Möglichkeit, mittels der vorgestellten Methoden Aussagen zur Veränderung des NO-Stoffwechsels zu treffen, wurde im Tiermodell mit aktiviertem Immunsystem untersucht. Ratten wurden mit Zymosan behandelt, wobei eine Stimulation der Immunabwehr bewirkt wird. Durch folgende Methoden wurden die Auswirkungen auf den NO-Stoffwechsel analysiert:

1. Messung der Nitrat-Ionenkonzentration im Plasma mittels GC-MS
2. HbNO-Quantifizierung in den Erythrozyten mittels ESR-Spektroskopie
3. Nachweis der Enzymexpression der iNOS in den Geweben mittels Western-Blot
4. Messung der Aktivität der NOS in den Geweben

3.7.1 Material und Methoden

Für die Versuche wurden fünf männliche Wistar-Ratten mit einem Gewicht von ca. 200 g verwendet, von denen drei Tiere zur Zymosan-Gruppe gehörten. Injektionen und Organentnahme erfolgten unter Methohexital-Narkose⁵⁹ (60 mg/kg Gewicht; i.p.). Für die Stimulation der Immunabwehr wurde Zymosan A aus *Saccharomyces cerevisiae*⁶⁰ in isotonischer Kochsalzlösung mit einer Dosis von 3 mg/100 g Lebendgewicht/Tag in die Schwanzvene appliziert. Die Substanz wurde an zwei aufeinanderfolgenden Tagen injiziert; die dritte Injektion erfolgte am vierten Tag. Die Organentnahme wurde am fünften Tag nach Herzpunktion zur Blutgewinnung durchgeführt. Die Organe wurden sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert. Das Blut wurde zur Separation der Erythrozyten zentrifugiert ($3000 \times g$), die Erythrozyten (200 μ l) wurden in ESR-Quarz-Röhrchen überführt und sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren, wo sie bis zur Messung gelagert wurden. Das Plasma wurde bis zur Analyse der Nitrat-Ionenkonzentration bei -70°C gefroren. Die weitere Verarbeitung des Probenmaterials erfolgte nach den Angaben in den jeweiligen Abschnitten über die genutzten Methoden.

3.7.2 Ergebnisse der Untersuchungen

In Tabelle 3.5 sind die Ergebnisse für die einzelnen Tiere dargestellt. Eine Zusammenfassung dieser Ergebnisse ist in Tabelle 3.6 zu finden.

3.7.3 Diskussion

Die Steigerung der NO-Biosynthese bei stimulierter Immunabwehr ist in etwa gleichem Ausmaß als erhöhte Plasmanitrat- und HbNO-Konzentration zu beobachten. Nachgewiesen werden kann eine Steigerung dieser Werte um den Faktor 30 gegenüber der Kontrollgruppe.

Mittels Western-Blot-Analyse der einzelnen Organe können Unterschiede in der Stärke der iNOS-Expression gezeigt werden: Die Zellen mit der höchsten Enzymexpression nach Zymosan-Stimulierung sind die Leukozyten, gefolgt von der Milz, der Lunge und der Leber. Die Blots für diese Organe sind in Abbildung 3.31 dargestellt. Diese Ergebnisse sind in ähnlicher Abstufung auch in anderen Studien mit Endotoxin-Stimulation mittels Immunhistochemie bzw. NOS-Aktivitätsbestimmung gefunden worden [19, 118]. Im Gegensatz zum Nachweis der in-vivo-NO-Produktion bei Zymosan-stimulierten Ratten mittels der Fe^{2+} -(DETC)₂-Methode (siehe Abschnitt

⁵⁹Brietal®; Lilly

⁶⁰SIGMA chemicals

Tabelle 3.5: Ergebnisse der verschiedenen NO-Quantifizierungsmethoden bei unbehandelten und immunstimulierten Ratten

Ratte	Kontrollen		Zymosan-Gruppe		
	K1	K2	Z1	Z2	Z3
Plasmanitrat ($\mu\text{mol/l}$)	9,3	4,7	59,4	284,5	219,6
HbNO ($\mu\text{mol/l}$)	1,0	0,8	3,2	49,0	39,0
Western Blot (densitometrische Einheiten ^a)					
Leber	0,1	0,5	24,7	59,6	39,9
Herz	0,0	2,2	7,3	19,3	31,6
Niere	0,0	1,0	12,3	20,9	22,6
Milz	1,0	0,4	72,8	83,7	77,9
Lunge	-	7,8	-	-	59,3
Jejunum	1,5	1,2	0,5	3,0	6,8
Leukozyten	-	2,9	-	72,8	95,2
NOS-Aktivität (pmol/mg/min)					
Leber	10,5	11,0	6,4	6,3	7,7
Herz	0,3	1,1	0,4	1,4	1,3

^aDie densitometrischen Einheiten sind auf den Standard umgerechnet und nicht vergleichbar mit den Angaben in Abschnitt 3.5.1

Tabelle 3.6: Steigerung der Parameter des NO-Stoffwechsels bei Zymosan-Stimulation. Zusammengefaßte Ergebnisse der beiden untersuchten Tiergruppen.

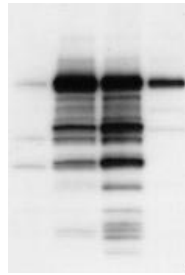
Ratte	Kontrolle	Zymosan	Faktor Zymosan/Kontrolle
Plasmanitrat ($\mu\text{mol/l}$)	7,0	187,8	26,8
HbNO ($\mu\text{mol/l}$)	0,9	30,4	33,8
Western Blot (densitometrische Einheiten)			
Leber	0,3	41,4	138,0
Herz	1,1	19,4	17,6
Niere	0,5	18,6	37,2
Milz	0,7	78,1	111,6
Lunge	7,8	59,3	7,6
Jejunum	1,4	3,4	2,5
Leukozyten	2,9	84,0	29,0
NOS-Aktivität (pmol/mg/min)			
Leber	10,7	6,8	0,6
Herz	0,7	1,0	1,6

3.2.3) ist hier im Nierengewebe eine iNOS-Expression mittels Western-Blot-Analyse nachweisbar. Damit ist jedoch keine Aussage über die NOS-Aktivität in vivo möglich, die in Abschnitt 3.2.3 in der Niere nicht nachweisbar war. Ein weiterer Unterschied kann beim Herzgewebe gezeigt werden: Während die iNOS-Expression in diesem Versuch relativ gering ausgeprägt ist, konnte durch die ESR-Trap-Methode eine nachweisbare NO-Produktion gefunden werden. Die Aussagen, die in beiden Untersuchungsmethoden zur Lokalisierung der NO-Produktion möglich sind, lassen jedoch nicht die Schlußfolgerung zu, daß die gewebespezifischen Zellen Ort der NO-Synthase-Expression bzw. der NO-Produktion sind. Einen großen Anteil an der Immunabwehr haben die eingewanderten Leukozyten, die durch keine der angewandten Methoden gesondert erfasst werden können.

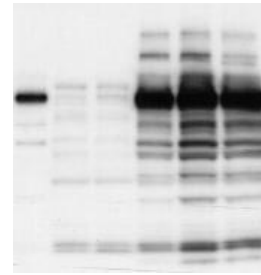
Für den Nachweis der erhöhten NO-Synthase-Aktivität nach Stimulierung des Immunsystems wurden die Leber und das Herz verwendet. Obwohl eine induzierte Enzymexpression mittels Western-Blot-Analyse gezeigt werden konnte, war es nicht möglich, eine Erhöhung der NOS-Aktivität zu messen. Während in den Herzen annähernd gleiche Enzymaktivitäten in beiden Tiergruppen gemessen wurden, waren die Werte in der Leber nach Zymosan-Stimulierung, wie in Abbildung 3.32 dargestellt, sogar erniedrigt.

Dieses Ergebnis hat offensichtlich methodische Ursachen, da durch die anderen angewendeten Methoden eindeutig die Steigerung der NO-Synthese in vivo bewiesen werden konnte. Es ist in den Geweben eine NOS-Inaktivierung zu beobachten, die durch die Zymosan-Behandlung dieser Tiere hervorgerufen sein muß, da sie in der Kontrollgruppe nicht im gleichen Verhältnis stattfindet. Um zu erfahren, an welcher Stelle eine Inaktivierung des Enzyms stattfindet, wurde zum Lebergewebe von Kontroll- und Verumgruppe vor der Homogenisierung aktive iNOS⁶¹ gegeben. Die Wiederfindungsrate im Gewebe der Zymosan-Gruppe war um 40% (± 10) niedriger als die der Kontrollgruppe. Es können folgende Möglichkeiten der Enzym-Inaktivierung diskutiert werden: Entweder könnten Stoffe, die durch die Immunreaktion gebildet wurden, z. B. Zytokine wie IL 4, IL 8, IL 10 oder TGF β für die geringere Aktivität der NO-Synthase verantwortlich sein; oder aber eine erhöhte Proteolyserate in den aktivierten Geweben könnte für die Zerstörung der aktiven Enzymform bei der Homogenisierung in Frage kommen. Andererseits ist auch eine Aktivitätshemmung durch negativen feed back nicht auszuschließen. In diesem Fall müßte jedoch zumindest die NO- bzw. Citrullin-Bildung meßbar sein, die für den negativen feed back verantwortlich ist. Der Nachweis hoher Konzentrationen der Metabolisierungsprodukte Nitrat und HbNO im Plasma

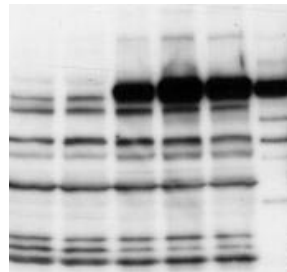
⁶¹Cayman chemicals



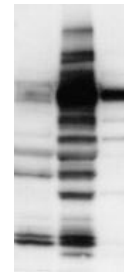
(a) Leukozyten: Bahn 1 – Kontroll-Ratte 2; Bahnen 2 und 3 – Zymosan-Ratten 2 und 3; Bahn 4 – iNOS-Standard (25 ng)



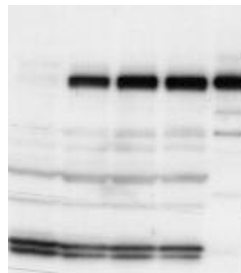
(b) Milz: Bahn 1 – iNOS-Standard (25 ng); Bahnen 2 und 3 – Kontroll-Ratte 1 und 2; Bahnen 4 , 5 und 6 – Zymosan-Ratten 1 , 2 und 3



(c) Leber: Bahnen 1 und 2 – Kontroll-Ratten 1 und 2; Bahnen 3 , 4 und 5 – Zymosan-Ratten 1 , 2 und 3; Bahn 6 – iNOS-Standard (25 ng)



(d) Lunge: Bahn 1 – Kontrolle 2; Bahn 2 – Zymosan-Ratte 3; Bahn 3 – iNOS-Standard (25 ng)



(e) Niere: Bahn 1 – Kontroll-Ratte 1; Bahnen 2 , 3 und 4 – Zymosan-Ratten 1 , 2 und 3; Bahn 5 – iNOS-Standard (25 ng)

Abbildung 3.31: Ergebnisse der Western-Blot-Untersuchungen einzelner Organe bzw. Zellpräparationen im Zymosan-Rattenmodell

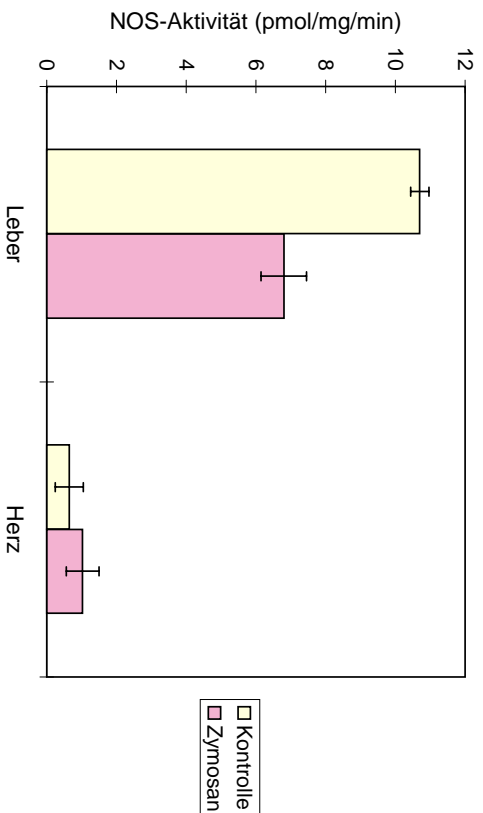


Abbildung 3.32: NOS-Aktivität bei Zymosanstimulation gegenüber Kontrollgruppe

der Zymosan-Gruppe und die relativ geringe Halbwertszeit dieser Verbindungen dokumentieren jedoch eine hohe Enzymaktivität in vivo. Sie unterliegt hier keiner so starken Hemmung, wie dies in vitro der Fall ist. Eine abschließende Aussage zur Interpretation dieser Beobachtungen ist an dieser Stelle nicht möglich. Die Ergebnisse belegen jedoch, daß die Messung der NOS-Aktivität durch die beschriebene Methode keine verlässlichen Ergebnisse erwarten läßt.

Die Untersuchungen zeigen aber auch, daß für Tierversuchs-Studien die HbNO-Bestimmung neben der Analyse der Plasmanitrat-Konzentration durchaus eine verlässliche Methode des Nachweises der gesteigerten NO-Produktion ist. Da bei Ratten eine stärkere Reaktion des NO-Stoffwechsels auf ein aktiviertes Immunsystem zu beobachten ist, wird die Nachweisgrenze des HbNO-Nachweises im Gegensatz zum Menschen überschritten.

3.8 Nutzbarkeit der Methoden in der medizinischen Praxis

Von den möglichen Methoden der Bewertung des NO-Stoffwechsels wurden sechs ausgewählte Verfahren hinsichtlich ihrer Anwendbarkeit in klinischen Studien untersucht. Dabei sind die Bedingungen der Probengewinnung ebenso wichtig wie die Eignung der Methoden, quantifizierbare Aussagen bezüglich der NO-Produktion zu ermöglichen.

Probenmaterial: Alle vorgestellten Verfahren sind für tierexperimentelle Untersuchungen anwendbar, da die Probengewinnung in der Regel nicht problematisch ist. Außerdem ist es eher vertretbar, Substanzen zu infundieren, deren Anwendung am Menschen nicht oder nur eingeschränkt möglich ist. Bei der in Abschnitt 3.2 diskutierten ESR-spektroskopischen NO-Quantifizierung wird Diethyldithiocarbamat eingesetzt, dessen Unbedenklichkeit bei kurzzeitiger Infusion in vielen tierexperimentellen Versuchen gezeigt wurde [79].

In Patientenstudien kommen hauptsächlich Verfahren in Frage, bei denen Blut oder Blutbestandteile als Untersuchungsmaterial dienen. Das sind die ESR-spektroskopische HbNO-Bestimmung, der Nitrit-/Nitratnachweis, die N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Quantifizierung sowie der Nachweis der NOS-Expression mittels Western-Blot-Analyse und der NOS-Aktivität in Zellen des Blutes, wie z.B. in Leukozyten und Thrombozyten.

Zuverlässigkeit: Hinsichtlich der Quantifizierbarkeit sind die Nitrit-/Nitratbestimmung ebenso wie die N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Bestimmung wegen ihrer statistisch sicheren Ergebnisse die geeigneten Methoden für klinische Untersuchungen. Von den Nitrit-/Nitratbestimmungsmethoden kommen bei Untersuchungen in Blutplasma die HPLC- wie auch die GC-MS-Methode in Frage.

Die HbNO-Quantifizierung ist für Tierversuchsstudien geeignet, in denen es zu einer starken Stimulation des NO-Stoffwechsels kommt.

Die anderen vorgestellten NO-Meßmethoden sind als ergänzende Methoden geeignet, um die Spezifität zu belegen. Beim ESR-spektroskopischen $NO-Fe^{2+}-(DETC)_2$ -Verfahren sind für die Quantifizierung technische Mittel Voraussetzung, die eine Subtraktion des überlagernden Cu^{2+} -Signals ermöglichen.

Stabilität der gemessenen Verbindung: Die Lagerfähigkeit der Proben vor der Weiterverarbeitung ist nicht für alle Verfahren gewährleistet. Lediglich bei der Nitratbestimmung ist eine Lagerfähigkeit der Proben über Stunden belegt, da NO_3^- das stabile Metabolisierungsprodukt von NO ist [98]. In dieser Hinsicht ist dies die Methode der Wahl.

Nitrosylhämoglobin ist kein stabiles Produkt des NO-Stoffwechsels im Blut. Der oxidative Abbau zu Methämoglobin und Nitrat verläuft mit einer Halbwertszeit von von 2 bis 3 Stunden [50]. Das Hauptproblem des HbNO-Nachweises ist allerdings die zu hohe Nachweisgrenze für humane Proben, so daß die Fragestellung der Stabilität nicht im Vordergrund steht.

Plasma oder Serum für die N^ω-Hydroxy-L-arginin-Bestimmung sollte sofort nach Blutabnahme separiert werden, da durch oxidativen Angriff leicht L-Citrullin gebildet wird.

Auch die Gewinnung der Blutzellen für die Western-Blot- und NOS-Aktivitäts-Analyse sollte aus frisch gewonnenem Blut erfolgen, da gerade Leukozyten ein hohes proteolytisches Potential besitzen und damit die Proteinstabilität nicht gewährleistet ist.

Störeinflüsse: Bei der Nitrit-/Nitratbestimmung ist es notwendig, den Einfluß von Ernährung, Medikamenten und Zigarettenrauch auszuschließen, um auf veränderte NO-Bildungsraten rückschließen zu können. So können entweder Patienten untersucht werden, die einen nitrit- und nitratreduzierten Diätplan eingehalten haben oder aber die Patienten werden stationär betreut und erhalten definierte nitrit- und nitratreduzierte Kost.

Die ESR-spektroskopischen Verfahren widerspiegeln die Veränderungen im NO-Haushalt ebenso spezifisch wie das N^ω-Hydroxy-L-arginin-Verfahren und der Nachweis der NOS-Enzymexpression und -aktivität. Diese Methoden unterscheiden sich jedoch in der nachgewiesenen Regulationsebene des NO-Stoffwechsels.

Aktualität der Aussage: Ein wichtiges Entscheidungskriterium ist auch, ob die Methoden Aussagen über die aktuelle Stoffwechselsituation ermöglichen. So ist die Nitratkonzentration ein relativ kurzfristiger Parameter für die Beurteilung des NO-Stoffwechsels, da die Erniedrigung der NO-Bildung innerhalb von Stunden als Verringerung der Plasma-Nitratkonzentration sichtbar wird.

Auch der HbNO-Nachweis ist wegen der kurzen Halbwertszeit des Moleküls ein aktueller Parameter.

Mit dem Nachweis der Enzymexpression und -aktivität ist dagegen keine Beschreibung des aktuellen Zustandes möglich, da das Enzym, einmal exprimiert, langanhaltend nachweisbar ist. Da Leukozyten im Blut nur etwa 14 Stunden zirkulieren, ist bei Untersuchung dieser Blutzellen auch eine aktuelle Aussage zu erwarten.

Für die N^ω-Hydroxy-L-arginin-Quantifizierung liegen bisher keine zeitabhängigen Studien vor. In Abschnitt 4.3.2 wird die N^ω-Hydroxy-L-arginin-Konzentration in Relation zur Plasma-Nitratkonzentration in einer Patientenstudie untersucht.

Bewertung: Aus den vorstehenden Ausführungen läßt sich schlussfolgern, daß die Nitrit-/Nitrat- und die N^ω-Hydroxy-L-arginin-Bestimmung sowohl für tierexperimen-

telle als auch für Patienten-Studien als Methoden zur NO-Stoffwechsel-Quantifizierung geeignet sind.

Der ESR-spektroskopische HbNO-Nachweis, der Western-Blot-Nachweis der Enzymexpression und die NOS-Aktivitätsbestimmung sind für klinische Patientenstudien vorrangig als ergänzende Methoden einsetzbar.

Damit sind zwei der sechs untersuchten Methoden für die Quantifizierung der NO-Stoffwechsel-Situation in Patientenstudien anwendbar, während die anderen Methoden nur für Studien, in denen keine quantifizierbaren Aussagen angestrebt werden, zu verwenden sind.

4 Patientenstudie: Sepsis und NO-Produktion

Die Anwendbarkeit der im Kapitel 3 vorgestellten Methoden an einer klinisch relevanten Patientengruppe wird im folgenden gezeigt. Es ist bereits bekannt, daß es bei Infektionen zu einer Steigerung der NO-Bildung kommt. Die dabei beobachtete erhöhte Nitratausscheidung im Urin [38] konnte erst mit der Identifizierung von NO als zytotoxischem Agens erklärt werden [87]. Durch Induktion der iNOS, vermittelt durch Bakterienendotoxine und Zytokine, können im Rahmen der unspezifischen Abwehr hohe NO-Konzentrationen gebildet werden.

Ein Extremfall von Infektion und Entzündung ist die Sepsis. Dieses Krankheitsbild kann bei einer Vielzahl von Primärerkrankungen auftreten. Die Inzidenz der Sepsis liegt in Westeuropa bei 5 Erkrankungen je 1000 Krankenhauspatienten [122]. Werden nur die Patienten von Intensivstationen betrachtet, so erhöht sich diese Zahl stark. Mit einer Inzidenz zwischen 5 und 20% und einer Mortalität zwischen 20 und 70% [10] ist Sepsis heute eine der häufigsten Todesursachen in der Intensivtherapie, da andere Todesursachen zunehmend beherrscht werden können. Damit ist diese meist sekundäre Komplikation ein wachsendes Problem der Intensivmedizin.

Eine Steigerung der NO-Bildung bei Sepsis ist vielfach belegt [27, 34, 106]. Dabei stehen den unersetzlichen Funktionen von NO in der Immunabwehr [84] auch schädigende Prozesse gegenüber, die durch NO vermittelt werden. Wegen seiner gefäßerweiternden Eigenschaften wird NO in diesem Zusammenhang auch als ein Mediator des hypotensiven septischen Schocks mit einer damit einhergehenden Steigerung der Mortalität betrachtet. Bei 40% der Patienten kommt es im Verlauf der Sepsis zum septischen Schock [7].

Durch die Quantifizierung der NO-Bildung bei Sepsispatienten kann die Rolle von NO im Verlauf der septischen Reaktion bewertet werden. Außerdem wird in der folgenden Studie die Veränderung physiologischer Parameter im Zusammenhang mit der modifizierten NO-Produktion betrachtet.

Nach tierexperimentellen Untersuchungen wurde die Anwendung von Medikamenten zur Hemmung der NO-Synthase [29, 81, 136] bereits bei Sepsispatienten erprobt, ohne jedoch damit eine Senkung der Mortalität zu erreichen [103, 108, 109]. So soll

diese Studie auch eine Differenzierung der Patienten ermöglichen, die einer Vorauswahl der für diese Therapie in Frage kommenden Patienten dienen könnte.

Die Nachweisbarkeit der iNOS-Expression und -Aktivität in den neutrophilen Granulozyten der Sepsispatienten wird in den Abschnitten 4.3.4.3 und 4.3.4 untersucht. Für diese weißen Blutzellen ist bisher nicht eindeutig nachgewiesen worden, daß beim Menschen eine iNOS-Expression stattfindet. Durch die Untersuchung der Zellen im stimulierten Zustand während der Sepsis werden eindeutigere Ergebnisse erwartet.

4.1 Sepsis

Da Sepsis ein sehr komplexes Krankheitsbild ist, gibt es unterschiedliche Definitionen und Diagnosekriterien. Die Grundlagen der Sepsisdefinition für die untersuchten Patienten werden in diesem Abschnitt erläutert.

4.1.1 Sepsissyndrom

Wurde Sepsis in der Vergangenheit primär über eine Allgemeininfektion mit Erregernachweis im Blut definiert, so steht heute nicht mehr allein der Erreger im Vordergrund, sondern die endogene systemische Reaktion des Organismus. Sepsis stellt wegen der allgemeinen pathophysiologischen Reaktion mit gestörter Regulation des Abwehr- und Entzündungsgeschehens einen Extremfall von Infektion bzw. Entzündung dar.

Mit folgender Definition der Sepsis [122] kann das komplexe Geschehen beschrieben werden:

Sepsis ist die Gesamtheit der lebensbedrohlichen klinischen Krankheitserscheinungen und pathophysiologischen Veränderungen als Folge der Aktion pathogener Keime und ihrer Produkte, die aus einem Infektionsherd in den Blutstrom eindringen, die großen biologischen Kaskadensysteme und spezielle Zellsysteme aktivieren und die Bildung und Freisetzung humoraler und zellulärer Mediatoren auslösen.

Damit sind fünf grundlegende Phänomene der mikrobiellen Sepsis beschrieben:

1. Ausgangspunkt ist ein septischer Fokus
2. Invasion von pathogenen Keimen und toxischen Keimprodukten in die Blutbahn
3. Mediatorexplosion
4. Zellschädigung als Ursache von Organschädigung
5. Multiorganinsuffizienz/Multiorganversagen.

Neben der mikrobiellen Sepsis wird das sepsisähnliche Syndrom beschrieben [122], das ein fast identisches Krankheitsbild zeigt und als „systemic inflammatory response syndrome“ (SIRS) bezeichnet wird. Es entsteht ohne eine primäre mikrobielle Infektion, ist jedoch auch durch eine Mediatorexplosion gekennzeichnet, als deren Folge klinisch Multiorganinsuffizienz und Multiorganversagen entstehen.

Als Hauptmediatoren des septischen Syndroms (das beide Erscheinungsformen der Sepsis umfaßt) werden heute neben den bakteriellen Endo- und Exotoxinen vor allem die Zytokine $\text{TNF}\alpha$ und IL 1 betrachtet. Aber auch IL 6, IL 8 und Interferon γ sowie reaktive Sauerstoffradikale, NO, Proteasen und das Gerinnungs- und Komplementsystem sind an der septischen Reaktion beteiligt [51, 135].

Die Komplexität des Sepsissyndroms ist Ursache für ein Spektrum von Kriterien zur klinischen Sepsisdiagnose. Folgende klinische Symptome werden als Diagnosekriterien der Sepsis herangezogen¹:

- Fieber oder Hypothermie
- Tachykardie
- Tachypnoe
- abnorme Leukozytenzahl
- Zeichen für Organdysfunktionen

Es können zwei Sepsisphasen unterschieden werden: Im Frühstadium überwiegt die hyperdynamische Reaktion mit Hyperventilation durch Sauerstoffdefizit, mit Tachykardie, hohem zentralvenösem Blutdruck, hohem Herzminutenvolumen und niedrigem peripheren Widerstand; das Spätstadium ist durch eine hypodynamische Reaktion mit sinkendem Blutdruck, sinkendem Herzminutenvolumen sowie daraus folgender verminderter Organdurchblutung gekennzeichnet.

Der septische Schock ist eine schwere Sepsis mit gegenüber Flüssigkeitsgabe refraktärer Hypotension, kardialer Insuffizienz und erniedrigtem peripheren Gefäßwiderstand. Er tritt bei ca. 40% der Sepsispatienten auf und ist mit einer hohen Mortalität verbunden [7].

Die Therapie der Sepsis ist neben der Antibiose hauptsächlich auf die Erhaltung der Vitalfunktionen gerichtet. Versuche, durch immunologische Therapie mit Antikörpern, die gegen einzelne Mediatoren gerichtet sind, eine kausale Therapie zu finden, haben bis heute zu keiner Senkung der Mortalität geführt.

¹nach American College of Chest Physicians/Society of Critical Care Medicine - ACCP/SCCM-Consensus Conference Committee [8, 9]

4.1.2 NO-Bildung bei Sepsis und ihre Folgen

Konnte einerseits die endotoxin- und mediatorinduzierte NO-Bildung als Folge des Infektions- und Entzündungsgeschehens beobachtet werden, so wird andererseits die Wirkung von NO mit der Manifestation von Symptomen des septischen Schocks in Zusammenhang gebracht. Viele Autoren gehen davon aus, daß die NO-Wirkung zumindest mitverantwortlich für die massive Blutdruckerniedrigung in der hypodynamen Sepsisphase ist und damit eine der Ursachen des therapieresistenten septischen Schocks [27, 34, 81, 106, 131, 142]. Folgen der Blutdruckerniedrigung sind einerseits die ungenügende Organperfusion, wodurch die Multiorganinsuffizienz weiter verstärkt wird. Andererseits kann es nach Stabilisierung des Blutdrucks zum Reperfusionssyndrom mit weiterer Organschädigung kommen [10].

Um die Ausprägung des septischen Schocks mit seinen erhöhten Gefährdungen zu verhindern, wird unter anderem die Hemmung der hohen NO-Produktion angestrebt [10, 28, 66, 108, 109]. Grundlage solcher Therapieansätze ist jedoch die Kenntnis der Regelmechanismen der NO-Produktion. In den veröffentlichten Studien ist größtenteils der Blutdruckabfall als Kriterium für den Einsatz von NOS-Hemmern bei Sepsis herangezogen worden. Ob dieser Risikofaktor ausschließlich Folge der NO-Wirkung ist, muß bezweifelt werden, da die Anregung von Kaskadensystemen wie des Kallikrein-Kinin-Systems oder des Arachidonsäure-Systems auch die Bildung vasoaktiver Mediatoren zur Folge hat [122].

4.2 Patienten

In die prospektive Studie zur Quantifizierung der NO-Bildung wurden insgesamt 34 intensivmedizinisch betreute Patienten einbezogen, von denen an bis zu 45 verschiedenen Zeitpunkten Blut als Probenmaterial genommen wurde. Um eine möglichst heterogene Sepsisgruppe einzuschließen, wurden bezüglich der Erreger und der Primärerkrankung keine Einschränkungen bei der Patientenauswahl vorgenommen. Es wurde ein Beginn der Probennahme 2 bis 3 Tage vor der Ausprägung der klinischen Sepsissymptome angestrebt. Beendet wurde sie 3 bis 5 Tage nachdem die klinischen Zeichen für die Infektion letztmalig nachweisbar waren.

4.2.1 Angewendete Sepsiskriterien

Von den untersuchten Patienten wurden diejenigen der Sepsisgruppe zugeordnet, die an mindestens zwei aufeinanderfolgenden Tagen die in Tabelle 4.1 genannten klinischen und paraklinischen Zeichen einer systemischen Entzündungsreaktion aufwiesen [9].

Tabelle 4.1: Sepsiskriterien nach Bone [9]

Herzfrequenz	> 100 Schläge/min
Körpertemperatur	> 38,5°C / < 36,6°C
Atemfrequenz	> 28 Atemzüge/min bei FiO ₂ 0,21
Atemminutenvolumen	> 10 l/min bei FiO ₂ > 0,4 und bei PEEP 5 cm H ₂ O
Leukozyten	> 12 × 10 ³ oder < 4 × 10 ³ /μl
Hypotension	
RR systolisch	< 91 mm Hg
oder	
Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP)	< 76 mm Hg
oder	
erforderliche Katecholamindosis	Dopamin > 5 μg/kg/min oder erforderliche Adrenalin- od. Noradrenalingabe
und	
zwei der folgenden Symptome	
inadäquater Organfunktion	
Urinmenge	< 30 ml/h (über 2 h)
Thrombozyten	< 100 × 10 ³ /μl oder < 50% des Vorwertes
Laktat	> 2 mmol/l

4.2.2 Einteilung der Patienten

Da für die verwendeten Methoden prinzipiell Referenzwerte außerhalb der Studie vorliegen, wurden in die Kontrollgruppe nur drei Patienten zur Überprüfung dieser Werte unter intensivmedizinischer Therapie aufgenommen. Als Kontrollwerte wurden bei den Parametern des NO-Stoffwechsels die in den entsprechenden Methodenabschnitten aufgeführten Referenzwerte genutzt. Die Patienten, bei denen lokalisierte Infektionen ohne systemische Entzündungserscheinungen diagnostiziert wurden (keine Erfüllung der Sepsiskriterien), wurden in einer Infektionsgruppe zusammengefaßt. Die Sepsisgruppe umfaßte insgesamt 24 Patienten (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Charakterisierung der Patientengruppen

	Kontrolle	Sepsis	Infektion
Anzahl	3 Pat.	24 Pat.	7 Pat.
Überlebende	3 Pat.	10 Pat.	6 Pat.
Alter: Mittelwert	36	56,3	55
Spanne	29 - 46	25 - 76	45 - 72
Geschlecht w/m	1/2	6/18	3/4
Primärerkrankung	Thalamustumor Pankreatitis Polytrauma	siehe Tabelle 4.3	Bauchaortenaneurisma, Polytrauma, Hirnblutungen, Hirnstamm-tumor, Herzschritt-macher-OP, LWS-Fraktur

Die Sepsispatienten sind durch die in Tabelle 4.3 gezeigten Erkrankungen bzw. Erreger charakterisierbar. Die dort vorgenommene Aufteilung der Sepsispatienten in zwei Gruppen wird im Abschnitt 4.3.1.1 zur Nitratkonzentration im Plasma erläutert.

4.3 Nachgewiesene Parameter der NO-Produktion

In erster Linie wurde die Nitratkonzentration im Plasma der Patienten als Marker der NO-Biosynthese analysiert. Die Patienten können so hinsichtlich der NO-Produktion miteinander verglichen werden. Es wird dann der Zusammenhang der Nitratkonzentration mit der Veränderung physiologischer Parameter untersucht. Außerdem wird untersucht, ob Regelmäßigkeiten der zeitlichen Entwicklung der NO-Produktion zu finden sind.

Tabelle 4.3: Charakterisierung der Sepsispatienten

Sepsis-patienten	Primärerkrankung (Sepsisherd)	nachgewiesene Erreger
ohne gesteigerte Plasma-nitratkonz. (Sepsis-gruppe 2)	1 Beckenaorten-Bypass (Pankreatitis/Pneumonie) 2 Dünndarmperforation (Peritonitis) 3 Larynxkarzinom (Pneumonie) 4 Sinusitis (Endocarditis) 5 Thoraxtrauma (Pneumonie, Kathetersepsis) 6 Nephrektomie, (Pneumonie, Wundinfektion) 7 Weichteilinfektion der Hüfte, (Pneumonie) 8 Urosepsis	Xanthomonas maltophilia Escherichia coli, Bact. fragilis Corynebact. striat., Candida Pneumokokken Klebsiella pneumoniae, Staphylococcus epidermidis/hominis Pseudomonas aeruginosa Candida Enterokokken Candida albicans Escherichia coli
mit gesteigerter Plasma-nitratkonz. (Sepsis-gruppe 1)	1 Weichteilinfektion(sept. Hüfte) 2 Hirnbasisaneurisma (Pneumonie) 3 Mesenterialvenenverschluß (Peritonitis, Pneumonie) 4 Polytrauma (Pneumonie) 5 koronarer Bypass (Pneumonie) 6 Dermatomyositis (Pulmonie) 7 Nierenkarzinom, Darmperforation (Pankreatitis, Pulmonie) 8 Morb. Recklinghausen (Drainageninfektion) 9 Hirnbasisaneurisma (Pneumonie) 10 Lebertransplantat. (Peritonitis) 11 Harnstauungsniere (Pneumonie) 12 Aortenaneurisma (Pneumonie, Blaseninfekt.) 13 card. Schock (Decubitusulcus) 14 TM-Nephrektomie (Pneumonie) 15 Blasen-TM (Peritonitis) 16 Nierentumor (Pneumonie)	Staphylokokken, Enterokokken, Klebsiella pneumon. Staphylokokken, Candida alb. Pseudomonas aeruginosa/cepacia, CMV Staphylokokken Staphylokokken, Candida Staphylo-, Streptokokken, Candida, CMV Klebsiellen, Corynebacter Staphylococcus haemolyt./hominus/epidermidis Staphylokokken, Pseudomonas aeruginosa, CMV Staphylokokken, Aspergillus, CMV Staphylococcus aureus, Pseudomonas aeruginosa Enterobacter cloacae, Candida Pseudomonas aerug. Candida alb., Serratia marc. Pseudomon. aerug., Enterococcus faecalis, Staphylococcus aureus/epidermidis Escherichia coli, Enterobacter cloacae

Als ergänzende Methode zum Nachweis der gesteigerten NO-Biosynthese wurde die N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Konzentration im Plasma einzelner Patienten bestimmt. Unter Einbeziehung der gleichzeitig analysierten L-Arginin-Konzentration können auch methodische Aspekte betrachtet werden, die bei dieser speziellen Patientengruppe in den Vordergrund treten.

Geprüft wurde auch die Möglichkeit des Nachweises von HbNO in den Erythrozyten.

Weiter werden die Ergebnisse von Untersuchungen an neutrophilen Granulozyten einzelner Sepsispatienten gezeigt. Die mögliche Expression der iNOS in diesen weißen Blutzellen wurde mittels Immunofluoreszenz- sowie Western-Blot-Analyse und durch Bestimmung der NOS-Aktivität analysiert.

4.3.1 Nitratkonzentration im Plasma

Die NO-Bildung im Verlauf der Sepsis wurde durch die Messung der Nitratkonzentration im Plasma mittels GC-MS erfaßt. Die Ernährung ist bei den intensivtherapeutisch betreuten Patienten kein Störfaktor dieser Meßgröße, wie schon in Abschnitt 3.3.3.3 gezeigt werden konnte. Wegen der hauptsächlich parenteralen oder zumindest leichten Ernährung der Intensivpatienten wurden Maximalwerte der Nitratkonzentration von $45 \mu\text{mol/l}$ im Plasma der Kontrollpatienten gemessen.

4.3.1.1 Nitratkonzentration und Differenzierung der Sepsispatienten

Die Nitratkonzentration im Plasma der Sepsispatienten war gegenüber der eines Probandenkollektivs mit nitratreduzierter Ernährung (siehe Abschnitt 3.3.3.3) deutlich erhöht. Der Mittelwert der Kontrollgruppe beträgt $23,1 \mu\text{mol/l}$; dagegen wurde in der Gruppe der Sepsispatienten eine mittlere Nitratkonzentration² von $100,1 \mu\text{mol/l}$ ($s \pm 63,1$) gemessen. Der Unterschied zwischen diesen Patienten-Gruppen ist mit $p < 0,0001$ hochsignifikant (zweiseitiger t-Test, ungleiche Varianz der Stichproben). Auch bei den Patienten der Infektionsgruppe konnte mit $53,1 \mu\text{mol/l}$ ($s \pm 15,2$) eine erhöhte Nitratkonzentration im Plasma gemessen werden. Der Unterschied zur Kontrollgruppe war mit $p < 0,0005$ signifikant (zweiseitiger t-Test, ungleiche Varianz der Stichproben). Unter der Voraussetzung, daß die Plasma-Nitratkonzentration die NO-Bildungsrate widerspiegelt, konnte prinzipiell eine gesteigerte NO-Biosynthese bei den Sepsispatienten und bei den Patienten mit lokaler Infektion nachgewiesen werden.

²Die während des Zeitraumes der Erfüllung der Sepsiskriterien gemessenen Nitratkonzentrationen eines Patienten wurden gemittelt.

Es war jedoch erkennbar, daß im Plasma von acht Patienten der Sepsisgruppe nur eine geringfügige Erhöhung der Nitratkonzentration bis zu $60 \mu\text{mol/l}$ bei einem Mittelwert von $39,6 \mu\text{mol/l}$ ($s \pm 6,9$) nachweisbar war (Sepsisgruppe 2). Die anderen Sepsispatienten zeigten gegenüber dem Normalwert um das 4- bis 10fach erhöhte Plasma-Nitratkonzentrationen (Sepsisgruppe 1). Der Unterschied der Nitratkonzentration zwischen den beiden gefundenen Gruppen war mit $p < 0,0001$ signifikant (zweiseitiger t-Test, ungleiche Varianz der Stichproben). In Tabelle 4.3 wurden die Patienten schon entsprechend klassifiziert. Es gab zwischen den Sepsisgruppen keine Unterschiede bezüglich der Flüssigkeitsbilanz, da bei nachlassender Eigendiurese sofort Gegenmaßnahmen bis zur Dialyse ergriffen wurden. Wie schon in anderen Studien gezeigt wurde, ist auch der Effekt der Volumenersatztherapie auf die Nitratkonzentration sehr gering und führt nicht zu den beobachteten Unterschieden [61]. Außerdem zeigen die hier untersuchten Patienten geringe Schwankungen der Nitratkonzentration zwischen den einzelnen Zeitpunkten der Messung. Bei starken Einflüssen von Infusionen auf die Meßgröße wären größere Unterschiede innerhalb der Patientenverläufe zu erwarten.

In Abbildung 4.1 sind die Nitratkonzentrationen der vier Patientengruppen verglichen. Für jeden Patienten wurde der Mittelwert der Perioden der Sepsis bzw. Infektion einbezogen. Es kann davon ausgegangen werden, daß die Unterschiede der Plasma-Nitratkonzentration zwischen beiden Gruppen auf die verschieden starke NO-Bildung zurückzuführen sind.

4.3.1.2 Vergleich der Sepsispatienten-Gruppen

Im folgenden sollen durch Vergleich der Sepsispatienten-Gruppen mögliche Ursachen der verschiedenen Reaktion des NO-Stoffwechsels untersucht werden. Für das beobachtete Phänomen der Non-Responder³ hinsichtlich der NO-Produktion sind verschiedene Gründe denkbar. Es soll hier untersucht werden, ob es gemeinsame Merkmale in einer Sepsisgruppe gibt, die die Patienten der anderen Sepsisgruppe nicht aufweisen.

Am Ende des Abschnittes sind in Tabelle 4.4 die Werte zusammengefaßt, die den folgenden Ausführungen zugrunde liegen.

Patienten: Die Sepsisgruppe 1 weist ein geringeres Durchschnittsalter auf. Hier sind 25% der Patienten zwischen 20 und 40 Jahre alt, während zur Sepsisgruppe 2 kein Patient dieses Alters gehörte⁴. Die Geschlechtsunterschiede sind als zufällig zu betrachten.

³Als Non-Responder werden hier die Sepsispatienten mit geringer Erhöhung der Nitratkonzentration bezeichnet. Die Patienten mit sehr starker NO-Produktion werden Responder genannt.

⁴Beim statistischen Vergleich der Gruppen ist der Altersunterschied jedoch nicht signifikant

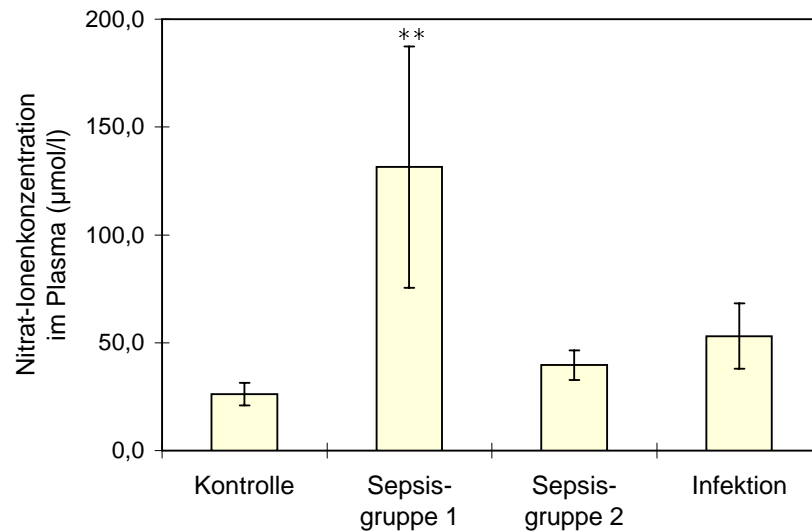


Abbildung 4.1: Nitratkonzentration im Plasma der Patienten mit und ohne Sepsis (Mittelwerte der Sepsis- oder Infektionsperiode des jeweiligen Patienten \pm s; ** $p < 0,0001$ gegenüber Kontrollgruppe, Sepsisgruppe 2 und Infektionsgruppe)

Nierenfunktion: In einigen Arbeiten wird der mögliche Einfluß der Nierenfunktion auf die Nitratkonzentration im Plasma diskutiert [27, 61, 106]. Es kann angenommen werden, daß sich bei gestörter Nierenfunktion die Nitratkonzentration im Plasma durch die verringerte Ausscheidung der Ionen erhöht. Durch Gegenüberstellung der Patienten mit Nierenversagen in den beiden gefundenen Gruppen dieser Studie kann jedoch ausgeschlossen werden, daß in der Responder-Gruppe ein erhöhter Anteil dieser Patienten untersucht wurde: Während in der Gruppe mit hohen Nitratkonzentrationen 43% der Patienten im Laufe der Sepsis ein Nierenversagen entwickelten, waren es in der Non-Responder-Gruppe 62,5%. Trotz Nierenversagens hatte also ein Teil der Sepsispatienten keine stark erhöhten Nitratkonzentrationen im Plasma.

Auch in anderen Studien konnte die Nierenfunktion als Ursache der Konzentrationserhöhung von Nitrat bei Sepsispatienten ausgeschlossen werden [27, 61]. Wie schon in Abschnitt 2.1.3 diskutiert, läßt sich die Kreatinin-Clearance nicht mit der Nitratausscheidung in Zusammenhang bringen.

Leukozytenzahl: Die Vermutung, daß die Leukozyten für die starke NO-Bildung verantwortlich sind, würde bei hohen Leukozytenzahlen im Blut von Sepsispatienten auch hohe Plasma-Nitratkonzentrationen nach sich ziehen. Beim Vergleich der Leukozyten-

zahlen der beiden Gruppen konnten jedoch keine Unterschiede gefunden werden. Das hängt auch damit zusammen, daß eine erhöhte Leukozytenzahl ein Einschlusskriterium für die Sepsisdiagnose war. Wenn in das Gewebe eingewanderte Leukozyten eine erhöhte NO-Syntheserate zeigen [93], so können diese Leukozyten trotzdem für die NO-Bildung verantwortlich sein.

Von Neilly et al. [104] wurde eine vorliegende Neutropenie für niedrige Nitratkonzentrationen bei vermuteter Sepsis verantwortlich gemacht. In der hier vorgestellten Studie waren die Leukozytenzahlen gemäß der Einschlusskriterien jedoch so hoch, daß bei einem Anteil der Neutrophilen von 55 bis 70% an der Gesamtleukozytenzahl keine Neutropenie aufgetreten sein konnte. Der zitierte Zusammenhang kann nicht die Ursache der geringen NO-Bildung der hier untersuchten Patienten sein, da unter den Sepsispatienten trotzdem solche mit niedriger Nitratkonzentration im Plasma waren.

Erreger: Bei der Suche nach einer Häufung bestimmter Erreger, die im Patientenmaterial identifiziert wurden, konnten bezüglich der Gramfärbung der Bakterien und damit des Endotoxin-Gehaltes keine Unterschiede zwischen den Gruppen gefunden werden⁵. In beiden Gruppen waren ebenso viele grampositive wie gramnegative Erreger Ursache der Sepsis. Damit kann gezeigt werden, daß neben der oft hervorgehobenen Bedeutung gramnegativer Keime für die Pathogenese der Sepsis eine Infektion mit grampositiven Erregern gleiche Folgen haben kann. Auch systemische Pilz-Infektionen kamen in beiden Gruppen gleichermaßen vor.

Es war jedoch festzustellen, daß in der Responder-Gruppe eine signifikant erhöhte Anzahl an Staphylokokken-Infektionen auftrat ($p < 0,05$; Fisher-Test). Es ist denkbar, daß bestimmte Endotoxine die NO-Synthese besonders stark induzieren.

Septischer Fokus: Die Patientengruppen mit starker und geringer NO-Bildung lassen sich weder nach dem septischen Fokus noch nach ihrer Primärerkrankung differenzieren. In beiden Gruppen ist Sepsis mit Pneumonie bei über 50% der Patienten diagnostiziert worden, was hauptsächlich auf die Häufung von Beatmungspneumonien zurückführbar ist. Weitere gehäufte Sepsisherde sind bei der geringen Patientenzahl nicht in größerer Anzahl zu finden.

Es konnte auch keine Häufung traumatischer Patienten in der Gruppe mit geringer NO-Bildung beobachtet werden. Je Gruppe ist ein Patient mit Trauma als Primärdiagnose enthalten, so daß das publizierte Phänomen der verminderten NO-Bildung bei Traumapatienten [61] hier nicht gefunden werden konnte.

⁵Sepsis durch gramnegative Erreger ist ein verbreitetes, gut untersuchtes Modell [15, 28, 46, 66].

Auswirkungen und Prognose: Eine größere Anzahl der Patienten der Responder-Gruppe entwickelte einen septischen Schock. Die blutdrucksenkende Wirkung von NO scheint also die Schockausbildung zu begünstigen.

Die Gruppen unterscheiden sich bezüglich des durchschnittlichen mittleren arteriellen Blutdrucks (MAP) jedoch nur geringfügig. Die publizierte Tendenz einer geringeren Nitrit- und Nitratkonzentration bei nicht-hypotensiven Sepsispatienten [142] konnte damit nicht bestätigt werden.

Die Anzahl der katecholaminpflichtigen Tage liegt in Sepsisgruppe 1 höher als in der Patientengruppe mit niedriger Nitratkonzentration.

Aus diesen Ergebnisse läßt sich ableiten, daß NO an der Entwicklung der therapie-refraktären Blutdruckerniedrigung beteiligt sein kann, daß es aber auch bei geringer NO-Bildung zu diesem Symptom der Sepsis kommt. Hinsichtlich der Katecholaminpflicht der Patienten besteht ein Zusammenhang zwischen NO-Bildung und Dauer der Therapie. Bezüglich der notwendigen Katecholamindosis sind jedoch keine Unterschiede zwischen den Gruppen zu finden.

Die Mortalität ist in der Respondergruppe im Gegensatz zur Inzidenz der Schockausbildung nur geringfügig erhöht.

Es kann abschließend gefolgert werden, daß es unter Sepsispatienten eine Gruppe gibt, die auf die systemische Infektion oder Entzündung nur geringfügig mit gesteigerter NO-Synthese reagiert. Mit der Erfüllung der Sepsiskriterien ist also nicht immer eine hohe NO-Produktion verbunden. Diese Tatsache ist unbedingt zu berücksichtigen, wenn durch Hemmung der NO-Synthese die Ausbildung eines septischen Schocks verhindert werden soll. Die Analyse der Plasma-Nitratkonzentration des Patienten vor der Therapie mit NO-Synthase-Hemmern ist Voraussetzung für den Einsatz dieser Substanzen. Wird diese Therapie ohne vorherige Sicherstellung einer gesteigerten NO-Bildung durchgeführt, ist ausschließlich mit den schädlichen Folgen der Hemmung der endothelialen cNOS bei den Non-Respondern zu rechnen, wodurch die Gewebepfusion weiter verringert und die Organdysfunktion verstärkt wird.

Die Anzahl der Patienten reicht hier nicht aus, um auf die Ursachen der ausbleibenden NO-Bildung bei einem Teil der Sepsispatienten zu schließen. Die gefundenen Tendenzen müssen an einem größeren Patientenkollektiv überprüft werden. Lediglich die erhöhte Anzahl von Staphylokokken-Infektionen in der Sepsisgruppe 1 könnte für einen Zusammenhang zwischen der Art des Erregers und dem Ausmaß der NO-Synthese-Induktion sprechen.

Tabelle 4.4: Vergleich der beiden gefundenen Sepsisgruppen (**signifikanter Unterschied)

Patienten	hohe Nitrat- konzentration (Sepsisgruppe 1)	niedrige Nitrat- konzentration (Sepsisgruppe 2)
Anzahl	16 Pat.	8 Pat.
Alter: Mittel Spanne	53,3 25 - 74	62,1 46 - 76
Geschlecht (w/m)	3/13 Pat.	3/5 Pat.
Nieren- versagen	7 Pat. 43,7%	5 Pat. 62,5%
durchschnittliche Leukozytenzahl	$16,2 \times 10^3 / \mu\text{l}$	$18,5 \times 10^3 / \mu\text{l}$
Erreger: gramnegativ Staphylokokken	ca. 50% 62,5% **	ca. 50% 12,5%
Überlebende Mortalität	6 Pat. 62,5%	4 Pat. 50%
Ausbildung eines septischen Schocks	7 Pat. 43,7%	1 Pat. 12,5%
katecholaminpflichtige Tage während der Sepsis	64%	47%
Noradrenalin	55%	47%
Adrenalin	17,4%	10%
MAP (mmHg)	67,4	73,8

4.3.1.3 Korrelation der Nitratkonzentration mit physiologischen Parametern der Sepsis

Um den Zusammenhang zwischen erhöhter NO-Produktion und davon beeinflusster physiologischer Größen zu untersuchen, wurden in der Sepsisgruppe 1 folgende Parameter mit der Entwicklung der Nitratkonzentration im Plasma verglichen:

Mittlerer arterieller Blutdruck

Katecholaminpflicht

Leukozytenzahl

Konzentration des C-reaktiven Proteins als Akute-Phase-Protein

Unter Nutzung aller vorhandenen Meßpunkte in dieser Gruppe wurde der Zusammenhang durch lineare Regressionsanalyse untersucht. Beispielfhaft soll außerdem der Verlauf dieser Parameter an einzelnen Patienten gezeigt werden.

Mittlerer arterieller Blutdruck (MAP): Wegen seiner vasoaktiven Eigenschaften wird NO für die massive Blutdruckerniedrigung bei Sepsispatienten mitverantwortlich gemacht. Folgendes Ergebnis der linearen Regressionsanalyse mit dem mittleren arteriellen Blutdruck (mmHg) als abhängiger Größe konnte gefunden werden:

Anstieg $m = -0,06$

Korrelationskoeffizient $r = -0,165$

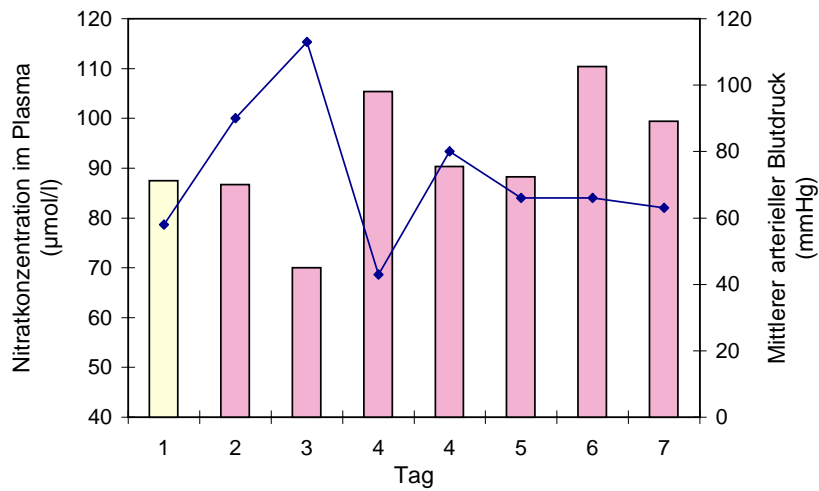
Signifikanz des Anstiegs $p < 0,05$

Zahl der Meßpunkte $n = 200$

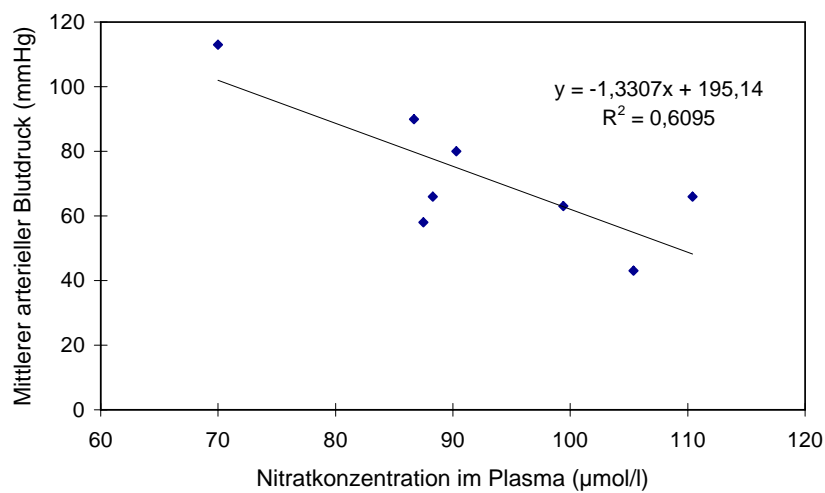
Der signifikant negative Anstieg der Regressionsgerade zeigt, daß mit steigender Nitratkonzentration im Plasma und damit gesteigerter NO-Biosynthese ein entsprechend niedriger mittlerer arterieller Blutdruck einhergeht. Es gibt einen linearen Zusammenhang zwischen NO-Produktion und Blutdruck, der jedoch nicht unbedingt ein ursächlicher ist. In Abbildung 4.2(a) ist der Zeitverlauf beider Größen bei einem Patienten dieser Gruppe dargestellt; Abbildung 4.2(b) zeigt die Regressionsgerade für diesen Patienten.

Daß in der Patientengruppe ohne erhöhte NO-Produktion ähnlich niedrige Blutdruckwerte beobachtet wurden, spricht für ein komplexes Geschehen, an dem NO beteiligt sein kann und auch eine Hauptrolle spielen könnte.

Katecholaminpflicht: Dieser Parameter ist in Korrelation zur NO-Produktion analysiert worden, um die Beteiligung von NO an der Therapieresistenz der Blutdruckerniedrigung während der Sepsis zu untersuchen. Es konnte folgendes Ergebnis der linearen Regressionsanalyse mit der Katecholamindosis (Adrenalin + Noradrenalin in



(a) Zeitverlauf der Nitratkonzentration und des mittleren arteriellen Blutdruckes (Säulen: Nitratkonzentration; Erfüllung der Sepsiskriterien an Tagen mit dunkel schraffierten Säulen; Punkte - MAP)



(b) Korrelation zwischen Nitratkonzentration und mittlerem arteriellen Blutdruck

Abbildung 4.2: Zusammenhang zwischen Nitratkonzentration und arteriellem Mittel-
druck bei einem Sepsispatienten der Gruppe 1

$\mu\text{g/kg/min}$) als abhängiger Größe gefunden werden:

Anstieg	$m = 0,0005$
Korrelationskoeffizient	$r = 0,25$
Signifikanz des Anstiegs	$p < 0,001$
Zahl der Meßpunkte	$n = 228$

Eine erhöhte NO-Produktion ist mit einem gesteigerten Bedarf an Katecholaminen zur Aufrechterhaltung des lebensnotwendigen Blutdruckes verbunden. Je höher die NO-Bildung während der Sepsis, desto schlechter ist also die Reaktion der Blutgefäße auf die gefäßverengende Wirkung der Katecholamine. In Abbildung 4.3(a) ist der Zeitverlauf beider Größen bei einem Sepsispatienten gezeigt, Abbildung 4.3(b) zeigt die Regressionsgerade für diesen Zeitverlauf.

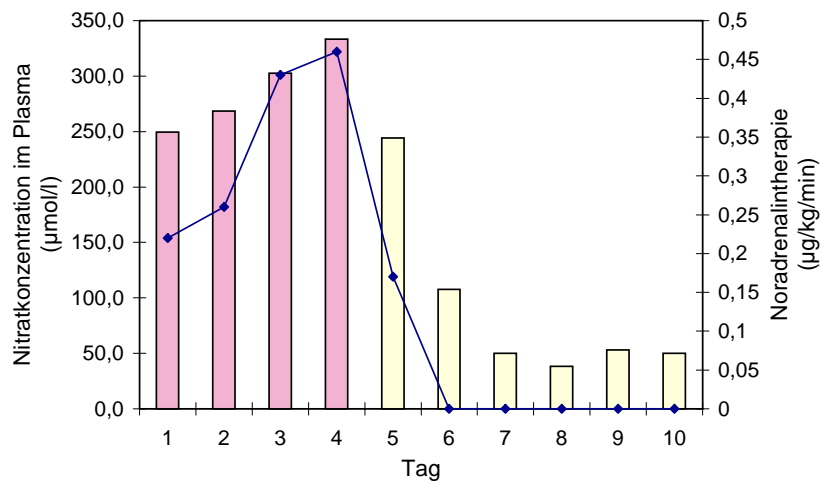
Auch für diesen Punkt läßt sich schließen, daß NO ein Faktor bei der Ausbildung der therapieresistenten Blutdruckdepression ist.

Leukozytenzahl: Wie schon erwähnt, werden die Leukozyten als eine wichtige NO-Quelle betrachtet. Ob ein Zusammenhang zwischen der Anzahl zirkulierender Leukozyten und Nitratkonzentration im Plasma besteht, wurde mittels linearer Regressionsanalyse mit der Nitratkonzentration ($\mu\text{mol/l}$) als abhängiger Größe untersucht. Folgendes Ergebnis war feststellbar:

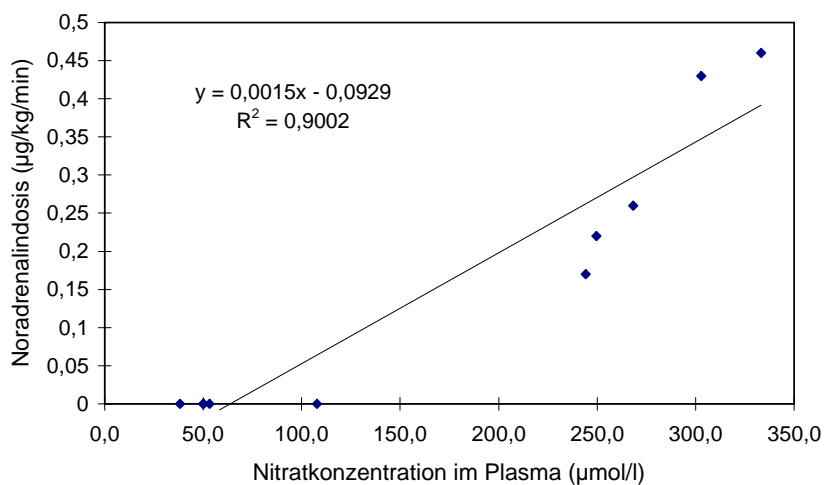
Anstieg	$m = 0,065$
Korrelationskoeffizient	$r = 0,006$
Signifikanz des Anstiegs	$p = 0,93$
Zahl der Meßpunkte	$n = 202$

Es konnte kein linearer Zusammenhang zwischen Leukozytenzahl und Nitratkonzentration im Plasma gefunden werden. Auch bei der Analyse mit anderen Regressionstypen war keine signifikante Abhängigkeit zu zeigen. Die Leukozytenzahl im Blut steht also nicht im Zusammenhang mit dem Ausmaß der NO-Produktion bei Sepsis. Je nach Sepsisfokus ist die NO-Produktion auf eine Aktivierung anderer Zellen und Gewebe zurückzuführen.

C-reaktives Protein: Das C-reaktive Protein ist ein Protein der γ -Globulinfraktion, das bei akuten infektiösen und nichtinfektiösen Entzündungen, septischen und aseptischen Nekrosen und Neoplasien vor allem in Leber und Lymphozyten gebildet wird. Es wird routinemäßig auch bei Patienten mit Sepsisverdacht bestimmt. Innerhalb von 6 bis 12 Stunden nach Entzündungsbeginn können die Normalwerte von 0,8 bis 3 mg/l auf bis zu 1000 mg/l ansteigen. Damit ist der Zeitraum der Reaktion ähnlich wie der

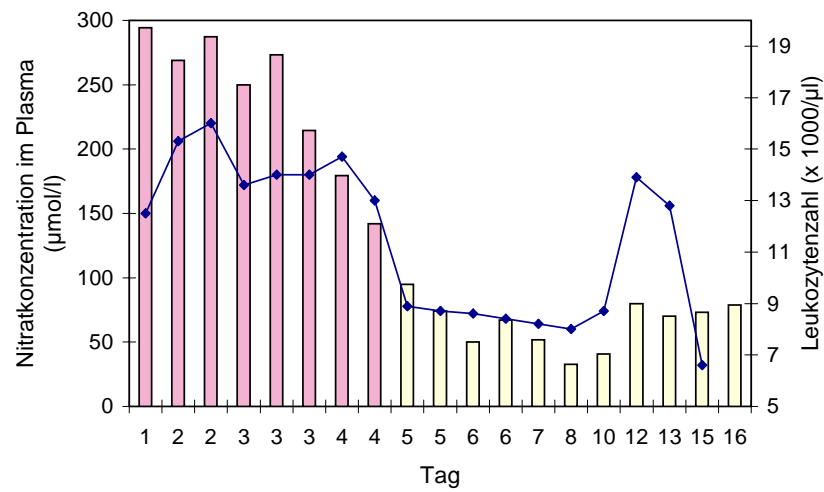


(a) Zeitverlauf der Nitratkonzentration und der erforderlichen Noradrenalingabe (Säulen: Nitratkonzentration; Erfüllung der Sepsiskriterien an Tagen mit dunkel schraffierten Säulen; Punkte: Noradrenalin-Dosis)

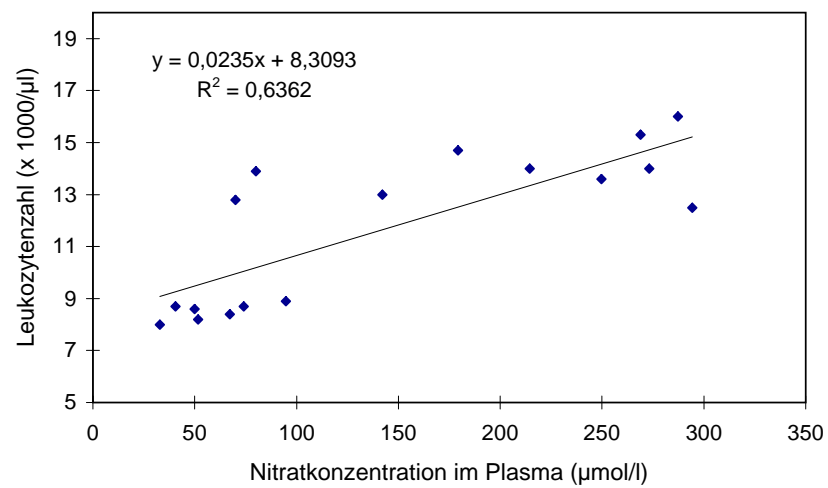


(b) Korrelation zwischen Nitratkonzentration und erforderlicher Noradrenalingabe

Abbildung 4.3: Zusammenhang zwischen Nitratkonzentration und Katecholaminbedarf bei einem Sepsispatienten der Gruppe 1



(a) Zeitverlauf der Nitratkonzentration und der Leukozytenzahl (Säulen: Nitratkonzentration; Erfüllung der Sepsiskriterien an Tagen mit dunkel schraffierten Säulen; Punkte: Leukozyten)



(b) Korrelation zwischen Nitratkonzentration und Leukozytenzahl

Abbildung 4.4: Zusammenhang zwischen Nitratkonzentration und Leukozytenzahl bei einem Sepsispatienten der Gruppe 1

der Induktion der NO-Biosynthese. Bei akuter Reaktion des NO-Stoffwechsels müßte eine Korrelation beider Parameter zu finden sein. In der linearen Regressionsanalyse mit der CRP-Konzentration (mg/l) als abhängiger Größe war folgendes Ergebnis feststellbar:

Anstieg	$m = 0,26$
Korrelationskoeffizient	$r = 0,228$
Signifikanz des Anstiegs	$p < 0,005$
Zahl der Meßpunkte	$n = 185$

Es besteht also ein linearer Zusammenhang zwischen diesen beiden Parametern in der Sepsisgruppe 1. Bei den Patienten mit Induktion der NO-Biosynthese kommt es zur etwa zeitgleichen Produktion von NO und CRP. Da sich die CRP-Konzentrationen in den Sepsisphasen der Patienten der beiden Gruppen mit unterschiedlich starker NO-Produktion aber nicht signifikant voneinander unterscheiden, ist der klinisch-chemische Parameter CRP-Konzentration nicht zur Beurteilung der NO-Bildung nutzbar.

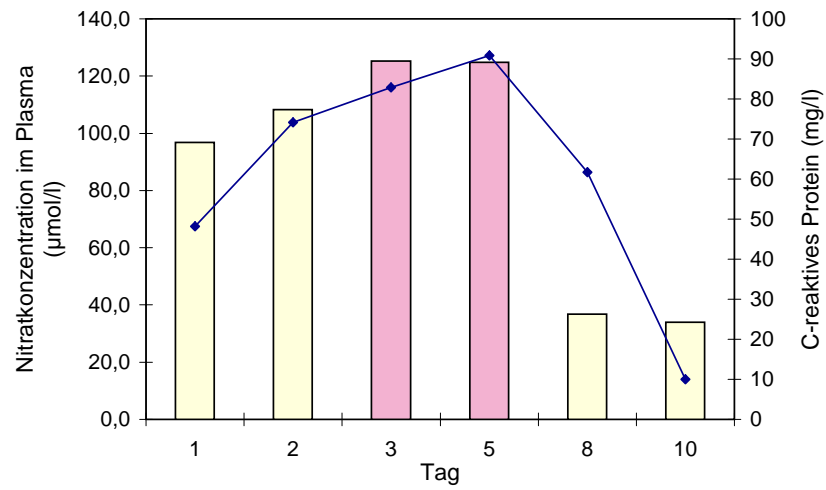
Abbildung 4.5(a) zeigt den Zeitverlauf der beiden Meßgrößen für einen Sepsispatienten. Die Regressionsgerade für diesen Patienten ist in Abbildung 4.5(b) dargestellt.

Es können zeitliche Zusammenhänge zwischen der NO-Bildung und physiologischen bzw. klinisch-chemischen Parametern gefunden werden, wenn es prinzipiell zur Induktion der NO-Biosynthese bei der Sepsis kommt. Es bestehen Korrelationen der NO-Bildungsstärke mit dem mittleren arteriellen Blutdruck (negativ) sowie dem Katecholaminbedarf der Patienten. Auch das Akute-Phase-Protein CRP ist etwa zeitgleich mit den Nitratwerten erhöht. Da jedoch im Gegensatz zur Nitratkonzentration für keinen der untersuchten Parameter signifikante Unterschiede zwischen den beiden Sepsisgruppen nachweisbar waren, ist eine alleinige Abhängigkeit dieser Größen von der NO-Konzentration nicht gegeben. Eine Abhängigkeit der Nitratkonzentration von der Zahl der zirkulierenden Leukozyten im Blut konnte nicht festgestellt werden.

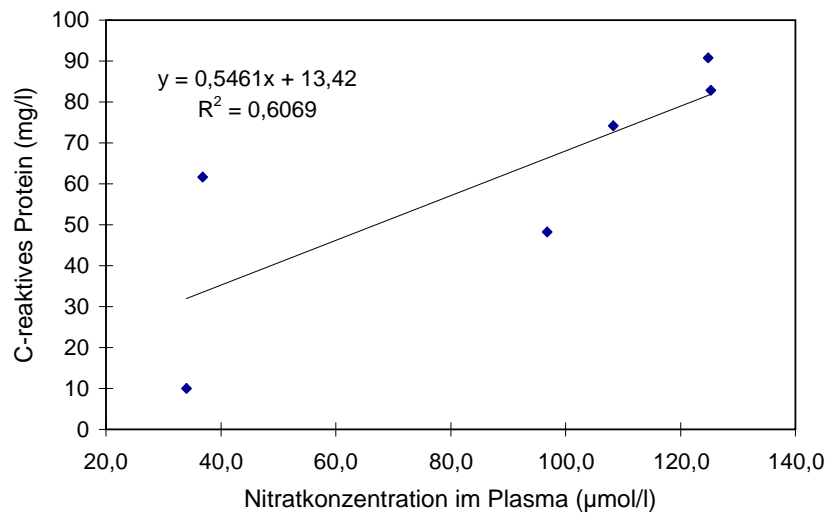
4.3.1.4 Zeitverlauf der Nitratkonzentration im Plasma

Da für jeden der Patienten ein Zeitprofil der Nitratkonzentration im Plasma gemessen wurde, konnte eine zusammengefaßte Zeitkurve für die Sepsispatienten ermittelt werden. Es wurden hier nur die Sepsispatienten der Gruppe 1 betrachtet.

Der Verlauf der Nitratkonzentration ist in Abbildung 4.6 dargestellt. Bei Vergleich des Durchschnittswertes der Nitratkonzentration für den jeweiligen Tag der Sepsis mit dem Durchschnittswert 3 Tage vor Sepsisbeginn konnte eine signifikante Erhöhung der Nitratkonzentration für folgende Tage gefunden werden:



(a) Zeitverlauf der Konzentrationen von Nitrat und C-reaktivem Protein (Säulen: Nitratkonzentration; Erfüllung der Sepsiskriterien an Tagen mit dunkel schraffierten Säulen; Punkte: CRP)



(b) Korrelation zwischen den Konzentrationen von Nitrat und C-reaktivem Protein

Abbildung 4.5: Zusammenhang zwischen der Konzentration von Nitrat und C-reaktivem Protein bei einem Sepsispatienten der Gruppe 1

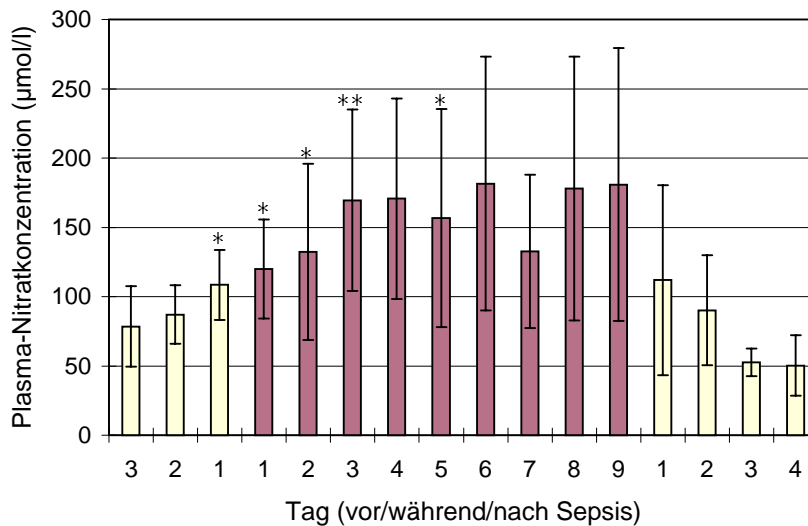


Abbildung 4.6: Zusammengefaßter Zeitverlauf der Nitratkonzentration im Plasma der Sepsispatienten der Gruppe 1 (Beginn: 3 Tage vor Erfüllung der Sepsiskriterien, Ende: 4 Tage nach letztmaliger Erfüllung der Sepsiskriterien; * $p < 0,05$; ** $p < 0,005$; Vergleich mit Wert 3 Tage vor Sepsisbeginn)

- 1 Tag vor erstmaliger Sepsisdiagnose ($p < 0,05$)
- Tag der erstmaligen Sepsisdiagnose ($p < 0,05$)
- 2. Tag nach Sepsisbeginn ($p < 0,05$)
- 3. Tag nach Sepsisbeginn ($p < 0,005$)
- 5. Tag nach Sepsisbeginn ($p < 0,05$)

Am 3. Tag nach Sepsisbeginn war diese Erhöhung mit $p < 0,005$ am deutlichsten (t-Test). Es kommt also ab dem Zeitpunkt, der kurz vor der Erfüllung der Sepsiskriterien liegt, über 3 bis 4 Tage hinweg zum Maximum der NO-Produktion (wenn diese überhaupt stimuliert ist).

Der Einsatz von NO-Synthase-Hemmern sollte bei nachgewiesener Erhöhung der Nitratkonzentration im Plasma zu dieser Zeit erfolgen, um die überschießende Reaktion abzufangen. Gleichzeitig ist es möglich, eine Erhöhung der Nitratkonzentration als ein Diagnosekriterium für den Beginn des Eintrittes in die Sepsisphase heranzuziehen. Das Ausbleiben dieser Reaktion kann jedoch keinen Einfluß auf die Sepsisdiagnose haben.

Um den Zusammenhang zwischen überschießender NO-Produktion und Ausbildung eines septischen Schocks zu untersuchen, wurde die eventuelle Gleichzeitigkeit der Ereignisse untersucht. So konnte festgestellt werden, daß der Zeitpunkt der Maximalwerte der Nitratkonzentration nicht mit dem Auftreten des septischen Schocks korrelierte. Die durchschnittliche Nitratkonzentration während des septischen Schocks

liegt bei $90,6 \mu\text{mol/l}$, während der durchschnittliche Maximalwert der Nitratkonzentration bei den entsprechenden Patienten bei $159,3 \mu\text{mol/l}$ liegt ($p < 0,05$, gepaarter t-Test). Eine zeitliche Abfolge beider Ereignisse war nicht feststellbar. Bei einigen Patienten ging die Nitrat-Maximalkonzentration der Ausbildung eines septischen Schocks bis zu 14 Tage voraus. Diese Reihenfolge war bei anderen Patienten umgekehrt.

Auch durch diese Untersuchungen läßt sich zeigen, daß NO keine ausschließliche Rolle bei der dekompenzierten Blutdruckerniedrigung während der Sepsis spielt.

4.3.2 N^ω -Hydroxy-L-arginin im Plasma

Bei einzelnen Patienten der Sepsisstudie wurde die N^ω -Hydroxy-L-arginin-Konzentration im Plasma bestimmt, wobei auch hier neben dem Vergleich der Patientengruppen der Zeitverlauf während der Sepsis im Mittelpunkt des Interesses stand.

Das Intermediärprodukt der NO-Biosynthese N^ω -Hydroxy-L-arginin kann bei gesteigerter NO-Produktion in erhöhter Konzentration im Extrazellulärraum bzw. Blutplasma nachgewiesen werden [92, 46, 121]. Zugleich wurde L-Arginin im Plasma der Patienten quantifiziert. So sind Rückschlüsse auf die Verfügbarkeit dieses Ausgangsstoffes der NO-Biosynthese möglich.

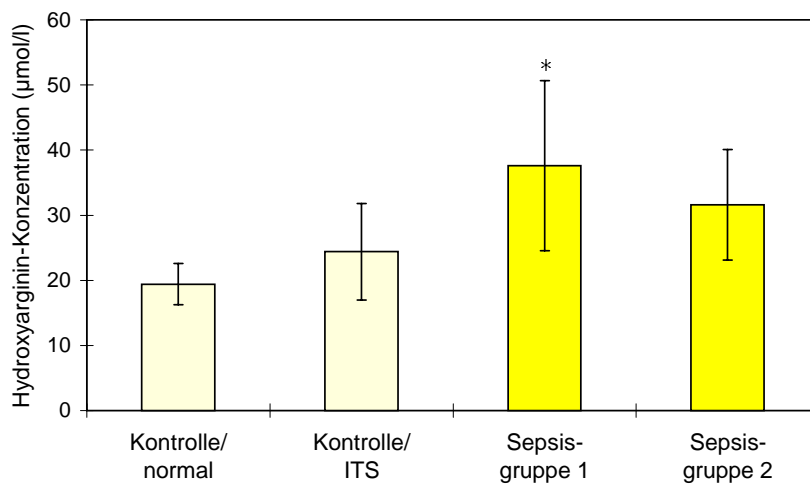
4.3.2.1 Vergleich der N^ω -Hydroxy-L-arginin- und der L-Arginin-Konzentrationen der Patientengruppen

Die Konzentrationen der Aminosäuren N^ω -Hydroxy-L-arginin und L-Arginin wurden, wie in Abschnitt 3.4 beschrieben, bestimmt.

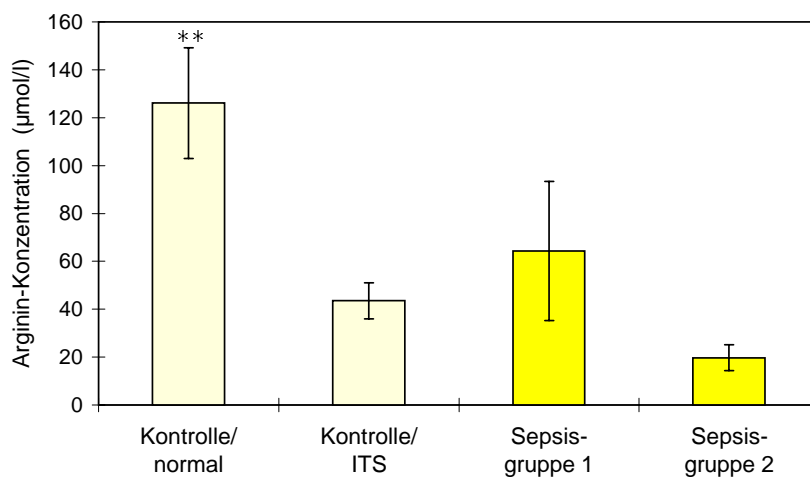
Unter der Voraussetzung, daß die Hydroxyarginin-Konzentration im Plasma unabhängig von der Nahrungszusammensetzung ist, wurden gesunde Probanden ($n = 17$) als eine Vergleichsgruppe zusammengefaßt. Von der Kontrollgruppe der Intensivstation wurden die Proben von zwei Patienten an 5 Tagen analysiert. Es sind sechs Sepsispatienten untersucht worden, wobei von der Sepsisgruppe 1 (mit hohen Nitratkonzentrationen) vier Patienten an insgesamt 29 Tagen und von der Sepsisgruppe 2 zwei Patienten an insgesamt 9 Tagen einbezogen wurden.

In Abbildung 4.7(a) sind die Ergebnisse der untersuchten Patientengruppen einander gegenübergestellt. Die Hydroxyarginin-Konzentration im Plasma von Kontrollpatienten der Intensivstation (ITS) lag etwas höher als die der Kontrollprobanden. Die Konzentration im Plasma aller untersuchten Sepsispatienten⁶ war gegenüber den

⁶Es wurde der Durchschnittswert jedes Patienten für den Zeitraum der Erfüllung der Sepsiskriterien ermittelt. Diese Konzentrationen wurden mit den Kontrollwerten verglichen.



(a) Vergleich der mittleren N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Konzentration im Plasma zwischen Kontroll- und Sepsispatienten ($\pm s$; * $p < 0,001$ gegenüber Kontrolle/normal)



(b) Vergleich der mittleren L-Arginin-Konzentration im Plasma zwischen Kontroll- und Sepsispatienten ($\pm s$; ** $p < 0,0001$ gegenüber allen Intensivpatienten)

Abbildung 4.7: Vergleich von N^{ω} -Hydroxy-L-arginin- und Arginin-Konzentrationen im Plasma (Sepsisgruppe 1: hohe Nitratkonzentration im Plasma; Sepsisgruppe 2: wenig erhöhte Nitratkonzentration)

Kontrollprobanden signifikant erhöht ($p < 0,001$; zweiseitiger t-Test mit ungleichen Varianzen).

Die in Abbildung 4.7(a) erkennbaren niedrigeren Hydroxyarginin-Werte der Sepsisgruppe 2 gegenüber der Sepsisgruppe 1 waren nur in der Tendenz nachweisbar. Es konnte aber bei Vergleich der Patienten der Sepsisgruppen mit den Kontrollprobanden nur für die Gruppe 1 eine signifikante Erhöhung der Hydroxyarginin-Konzentration nachgewiesen werden ($p < 0,05$, zweiseitiger t-Test mit ungleichen Varianzen).

Durch die Bestimmung der Hydroxyarginin-Konzentration im Plasma von Sepsispatienten konnte belegt werden, daß die erhöhte Nitratkonzentration auf eine gesteigerte NO-Bildung im Verlauf der Sepsis zurückzuführen ist.

Da neben der N^ω -Hydroxy-L-arginin-Konzentration auch die Konzentration von L-Arginin im Plasma bestimmt wurde, ist eine Gegenüberstellung der entsprechenden Werte möglich (Abbildung 4.7(b)). Es zeigte sich, daß die Arginin-Konzentration bei allen Patienten der Intensivstation gegenüber normal ernährten Probanden deutlich niedriger ist ($p < 0,0001$, zweiseitiger t-Test, ungleiche Varianzen). Ernährungs- und Stoffwechselsituation der Patienten haben also einen Einfluß auf die Konzentration des Ausgangsstoffes der NO-Biosynthese L-Arginin im Plasma [120]. Bisher wurde davon ausgegangen, daß bei einer ausreichend hohen Plasma-L-arginin-Konzentration von über $50 \mu\text{mol/l}$ genügend Substrat für die NO-Biosynthese zur Verfügung steht. Bei einer Erniedrigung der L-Arginin-Konzentration unter $50 \mu\text{mol/l}$ kommt es jedoch zu einer Wiederaufnahme von N^ω -Hydroxy-L-arginin über den Aminosäuretransporter y^+ aus dem Plasma in die Zellen und dort zu einer Verwertung durch die NO-Synthasen. Untersuchungen zeigten die Kompetitivität der basischen Aminosäuren für diesen Transporter [46, 92, 121].

Hinsichtlich der Plasma-L-arginin-Konzentration unterscheiden sich auch die beiden Sepsisgruppen: Die untersuchten Patienten, bei denen auch eine hohe Nitratkonzentration gefunden wurde, haben im Vergleich zu den Patienten, die keine Nitratkonzentration zeigten, zwei- bis vierfach höhere Arginin-Konzentrationen im Plasma. Damit könnte eine Erklärung für die verminderte NO-Produktion bei den Patienten der Sepsisgruppe 2 in einer Substratverarmung zu finden sein. Um die Abhängigkeit der Hydroxyarginin- von der Arginin-Konzentration ($\mu\text{mol/l}$) zu testen, wurden beide Werte durch lineare Regression gegenübergestellt. Folgendes Ergebnis war zu finden:

Anstieg	$m = 0,175$
Korrelationskoeffizient	$r = 0,34$
Signifikanz des Anstiegs	$p < 0,05$
Zahl der Meßpunkte	$n = 52$

Damit ist die Hydroxyarginin-Konzentration im Plasma nicht nur Ergebnis der NO-Bildung, sondern wird bei Sepsispatienten wesentlich von der L-Arginin-Konzentration im Plasma mitbeeinflusst. Durch die vermutete Wiederaufnahme in die Zellen ist die N^w-Hydroxy-L-arginin-Konzentration im Plasma so aber auch keine verlässliche Messgröße der NO-Biosynthese.

4.3.2.2 Zeitlicher Verlauf der N^w-Hydroxy-L-arginin-Konzentration im Vergleich zur Nitratkonzentration

Bei der Untersuchung eines möglichen Zusammenhanges zwischen Plasmanitrat- und N^w-Hydroxy-L-arginin-Konzentration zeigt sich, daß diese beiden Parameter der NO-Produktion nicht den gleichen zeitlichen Verlauf besitzen. Es zeichnet sich lediglich der Trend ab, daß die Erhöhung der N^w-Hydroxy-L-arginin-Konzentration mit dem Anstieg der Nitratkonzentration einhergeht. Durch lineare Regressionsanalyse konnte kein signifikanter Anstieg der Hydroxyarginin- mit der Nitrat-Konzentration gefunden werden. Das kann mit unterschiedlichen Zeitverläufen des Auftretens im Plasma zusammenhängen. Bei Anpassung der Trendlinie als polynomischer Typ ist erkennbar, daß gerade bei höheren Nitratkonzentrationen auch eine Wiederverwertung von N^w-Hydroxy-L-arginin bei der NO-Biosynthese stattzufinden scheint (Abbildung 4.8). Die Hydroxyarginin-Konzentration ist bei sehr hohen Nitratkonzentrationen niedriger.

Ein repräsentativer Zeitverlauf der N^w-Hydroxy-L-arginin- und Nitratkonzentra-

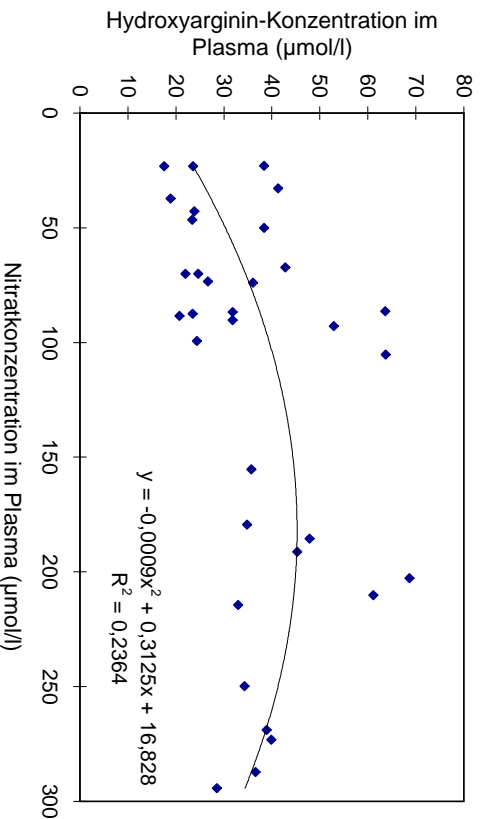


Abbildung 4.8: Zusammenhang zwischen Nitrat- und N^w-Hydroxy-L-arginin-Konzentration im Plasma (polynomische Anpassung)

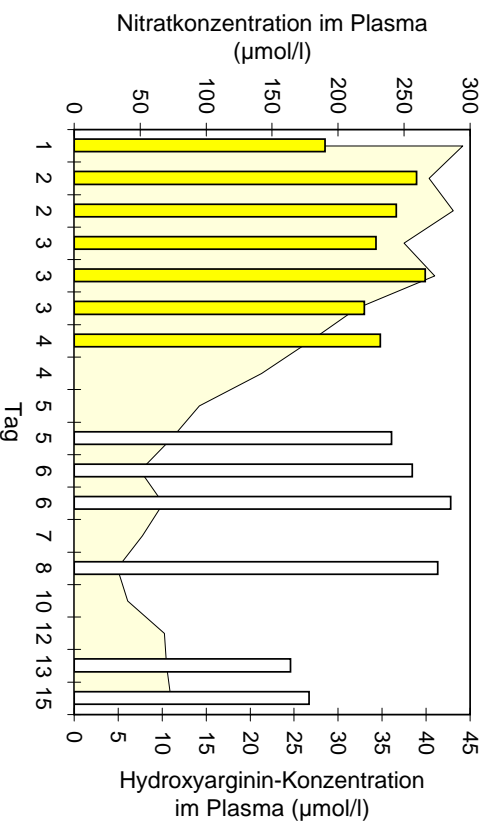


Abbildung 4.9: Vergleich der Nitrat- und der N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Konzentration im Plasma eines Sepsispatienten (Fläche: Nitratkonzentration; Säulen: Hydroxyarginin-Konzentration; Erfüllung der Sepsiskriterien an Tagen mit dunkel schraffierten Säulen)

tion bei einem Sepsispatienten der Gruppe 1 ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Die Maximalkonzentrationen der beiden Meßgrößen treten nicht zeitgleich auf. Außerdem ist kein Zusammenhang zwischen der Erfüllung der Sepsiskriterien mit dem Auftreten der höchsten Hydroxyarginin-Konzentrationen im Plasma zu finden. Es ist erkennbar, daß der erhöhte Hydroxyarginin-Spiegel länger nachweisbar ist als die hohe Nitratkonzentration. Erst einige Tage nachdem keine Sepsisdiagnose mehr vorliegt und damit auch die Nitratkonzentration abgefällt, sinkt die Hydroxyarginin-Konzentration im Plasma. Eine mögliche Erklärung der zeitlich verschobenen Maximalwerte von Hydroxyarginin ist die Substratfunktion dieser Aminosäure bei hoher NO-Syntheserate und verringerter Arginin-Konzentrationen.

Es sprechen also einige der Ergebnisse gegen die Möglichkeit, die N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Konzentration als Marker des Ausmaßes der NO-Biosynthese bei Sepsispatienten zu nutzen. Obwohl Hydroxyarginin ein spezifisches Produkt der NO-Synthasen ist, gibt es zu viele Einflußmöglichkeiten auf die Plasmakonzentration dieser Aminosäure. Der Vorteil, daß gerade im Vergleich zu Nitrat keine Nahrungsabhängigkeit der Plasmakonzentration von Hydroxyarginin in direktem Sinne besteht, wird durch die Intermediärprodukt- und Substratfunktion für die NO-Synthasen und Cytochrom-P450-Enzyme aufgehoben. Bei ausgewogenem Aminosäurestoffwechsel ist eine Rückaufnahme in die Zellen unwahrscheinlich, da der K_m -Wert des Aminosäuretransporters

ters für L-Arginin 100 $\mu\text{mol/l}$ beträgt, der Wert für Hydroxyarginin jedoch 200 $\mu\text{mol/l}$ [121]. Die Normalwerte von L-Arginin im Plasma sind etwa fünf- bis sechsmal so hoch wie die von Hydroxyarginin. Unter diesen Bedingungen wurde in verschiedenen Modellen etwa 10% der konsumierten L-Argininmenge als Hydroxyarginin im Extrazellulärraum wiedergefunden [46]. Kommt es jedoch durch die Organdysfunktion bei Sepsis zu einer gestörten Aminosäurebildung in der Leber und gestörter Resorption der semiessentiellen Aminosäure L-Arginin, so muß mit einer Wiederverwertung des Plasma-Hydroxyarginins gerechnet werden [92].

Für die Aktualität der Aussage ist ein Marker nötig, der die gerade vorliegende NO-Syntheserate widerspiegelt. Da die Nitratkonzentration sehr viel schneller sinkt als die Hydroxyarginin-Konzentration, kann von einer langsameren Elimination von Hydroxyarginin aus dem Plasma ausgegangen werden. Außerdem wird Hydroxyarginin bei geringerer NO-Synthese-Rate in sinkendem Maße in die Zellen zurücktransportiert.

Diese Überlegungen führen zu dem Schluß, daß die Bestimmung von N^ω -Hydroxy-L-arginin im Plasma von Sepsispatienten Nachteile gegenüber der Nitratbestimmungsmethode aufweist. Der Spezifität der Aminosäure für den NO-Stoffwechsel steht die Verwertbarkeit von Hydroxyarginin als Substrat der NO-Synthasen gegenüber. Lediglich bei Patienten mit hohem basalen Nitratspiegel, z. B. bei hoher Dosierung von NO-bildenden Vasodilatoren⁷, kann durch die Bestimmung von N^ω -Hydroxy-L-arginin die induzierte NO-Biosynthese spezifisch nachgewiesen werden, da bei dieser Methode keine Interferenzen mit exogenen Substanzen auftreten. Prinzipiell konnte die Steigerung der NO-Biosynthese bei Sepsispatienten durch N^ω -Hydroxy-L-arginin-Nachweis belegt werden. Jedoch wurden bei zehnfach erhöhten Nitratkonzentrationen lediglich doppelt bis dreifach erhöhte Werte gegenüber der normalen N^ω -Hydroxy-L-arginin-Konzentration gemessen.

4.3.3 Nitrosylhämoglobin in den Erythrozyten

Das Produkt der Reaktion von deoxyHb mit NO ist Nitrosylhämoglobin (HbNO). Obwohl HbNO Zwischenprodukt der Metabolisierung von NO zu Nitrit und Nitrat ist, kann es wegen seiner relativ hohen Stabilität (z. B. im Sepsismodell bei Ratten) in hohen Konzentrationen erfaßt werden (siehe Abschnitte 3.1.1 und 3.7). Allerdings war bei keinem der Sepsispatienten Nitrosylhämoglobin im Erythrozytenkonzentrat nachweisbar. Weder die Inkubation mit Dithionit noch die Messung der Proben in weniger als einer Stunde nach Abnahme konnte an diesem Befund etwas ändern. Trotz der teilweise sehr hohen Nitratkonzentrationen der Sepsispatienten wurde also im menschlichen Blut die Nachweisgrenze für HbNO nicht überschritten.

⁷Es waren keine Patienten mit kardiologischer Intensivtherapie in dieser Studie enthalten.

4.3.4 Expression und Aktivität der induzierbaren NO-Synthase in neutrophilen Granulozyten

Die Nachweisbarkeit der NO-Synthase-Expression bei Sepsispatienten ist an den weißen Blutzellen untersucht worden, da deren Anteil an der NO-Bildung nicht unumstritten ist. Während eine NO-Bildung durch kultivierte menschlichen Makrophagen bisher nicht eindeutig gezeigt werden konnte, liegen über menschliche neutrophile Granulozyten Berichte zu deren NO-Synthese-Aktivität vor [11, 37, 36, 143]. In Ratten-neutrophilen konnte der Nachweis des Vorhandenseins der NO-Synthase eindeutiger erbracht werden [89, 90, 125, 145].

4.3.4.1 Direkter Nachweis in fixierten Granulozyten mittels Immunofluoreszenz-Analyse

Die Immunofluoreszenz-Methode gestattet die Lokalisierung von Proteinen in Geweben oder Zellen. Eine Identifizierung des gesuchten Enzyms wird durch die Spezifität der verwendeten Antikörper möglich. Isolierte neutrophile Granulozyten von Sepsispatienten wurden für den Nachweis der iNOS-Expression verwendet.

Material und Methoden: Isolierte neutrophile Granulozyten⁸ wurden durch Methanol/Aceton auf Objektgläsern fixiert (1 : 1-Gemisch, 10 min, -20°C). In 96-Wellplatten wurde die Antikörperreaktion nach Protokoll 9 (Transduction laboratories) durchgeführt, wobei der primäre Antikörper⁹ in einer Konzentration von 5 µg/ml und der FITC-markierte sekundäre Antikörper¹⁰ in einer Konzentration von 20 bis 30 µg/ml eingesetzt wurde. Als Nachweis der Spezifität des sekundären Antikörpers wurde dieser in den Kontroll-Inkubationen ohne vorherige Behandlung mit primärem Antikörper verwendet. Die Gläsern wurden nach der Inkubation auf Objektträger in Glycerolgelatine eingebettet. Bei einer Absorptionswellenlänge von 480 nm war eine spezifische Fluoreszenz bei 520 nm detektierbar.

Nachweis der iNOS in neutrophilen Granulozyten von Sepsispatienten: Es konnte in allen untersuchten neutrophilen Granulozyten¹¹ eine spezifische Fluoreszenz nachgewiesen werden, unabhängig davon, ob diese von Sepsispatienten der Gruppe 1 oder 2 isoliert worden waren und ob die Sepsiskriterien zum Zeitpunkt der Blutentnahme

⁸nach Vorschrift in Anhang A.1

⁹anti-iNOS-Antikörper, monoklonal; Transduction laboratories

¹⁰anti-Maus-IgG; Dianova

¹¹Es wurden die Granulozyten von vier Sepsispatienten untersucht.

erfüllt waren oder nicht. Beispielhaft ist die Fluoreszenz in den neutrophilen Granulozyten eines Patienten in Abbildung 4.10 dargestellt. Die unspezifische Fluoreszenz ist die Fluoreszenz, die nur durch unspezifische Bindungen des sekundären Antikörpers hervorgerufen wird.

Erkennbar ist, daß die detektierte Struktur im Zytosol der Zellen lokalisiert ist und die Bereiche des Zellkernes oder der Zellmembran frei von davon sind.

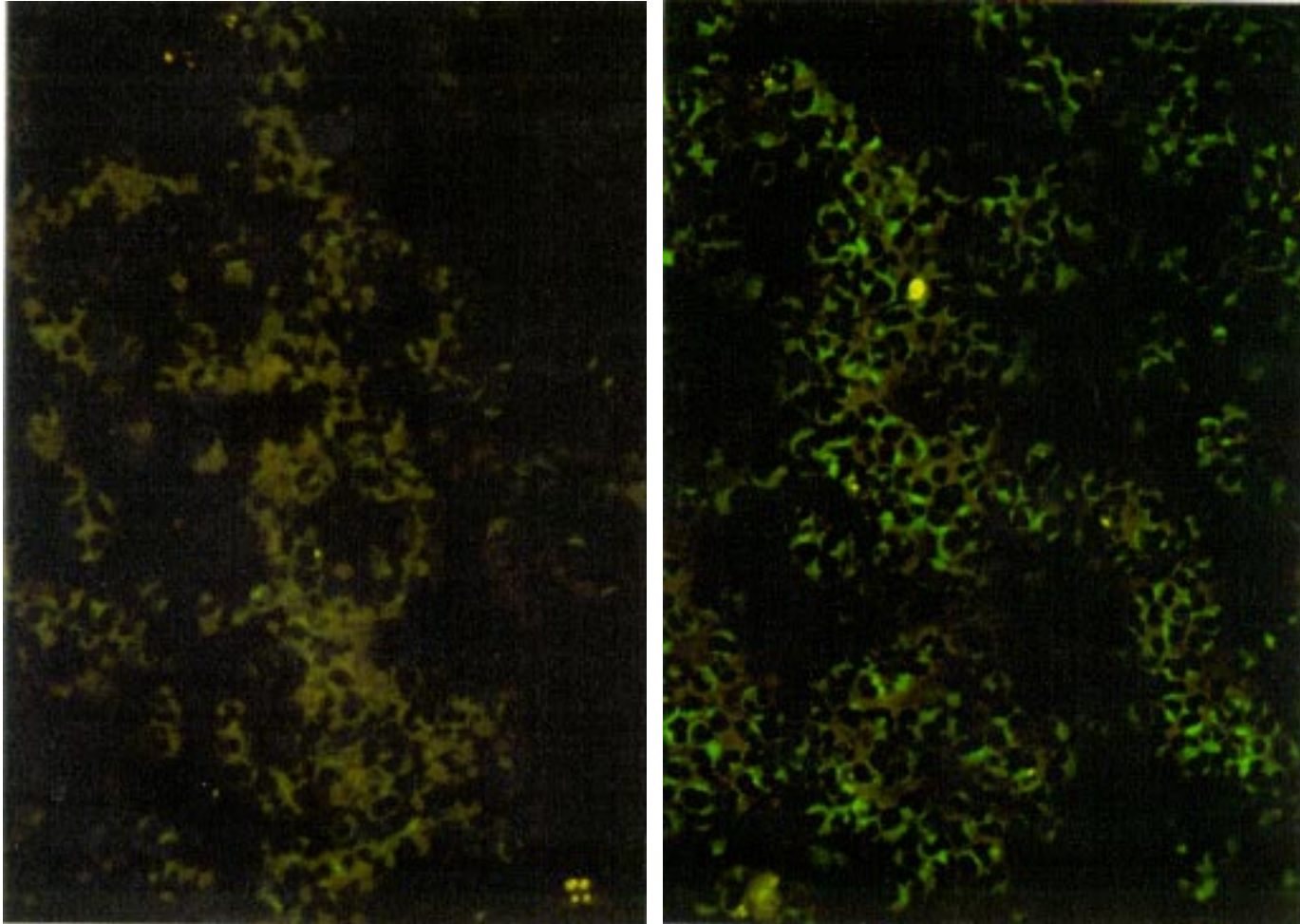


Abbildung 4.10: Vergleich der spezifischen Fluoreszenz der neutrophilen Granulozyten eines Sepsispatienten (rechts) mit der unspezifischen Fluoreszenz derselben Granulozytenpräparation (links)

4.3.4.2 Western-Blot-Analyse

Während durch die Immunofluoreszenz-Analyse die Lokalisierung der gesuchten Struktur gut zu zeigen ist, steht bei der Western-Blot-Analyse die Identität des Enzyms im Mittelpunkt. Durch die elektrophoretische Auftrennung des Proteingemisches dient die Bestimmung der Proteingröße neben den Antigen-Eigenschaften für den spezifischen Antikörper als Identifizierungsmerkmal des Enzyms.

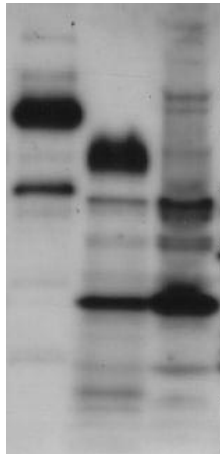
Material und Methoden: Die nach Vorschrift A.1 isolierten neutrophilen Granulozyten wurden sofort mit Probenpuffer¹² aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Es wurden 70 µg Protein je Bahn mittels SDS-PAGE getrennt. Die weiteren Schritte richteten sich nach Protokoll in Abschnitt 3.5.1, da die dort genutzten Antikörper auch mit humaner iNOS reagieren.

Ergebnisse der Untersuchungen: In den Proben der Sepsispatienten (n = 6) konnte eine Proteinstruktur in den neutrophilen Granulozyten gefunden werden, die iNOS-Antigen-Eigenschaften besitzt (siehe Abbildung 4.11(a)). Sowohl mit dem polyklonalen als auch mit dem monoklonalen iNOS-Antikörper¹³ wurde die gleiche Proteinbande detektiert. Im Gegensatz zu den Granulozyten der Sepsispatienten war dieses Protein in den Proben der Kontrollpatienten nicht nachzuweisen. Es konnte kein Zusammenhang zwischen der Stärke der detektierten Proteinbande und der Nitratkonzentration im Blutplasma gefunden werden.

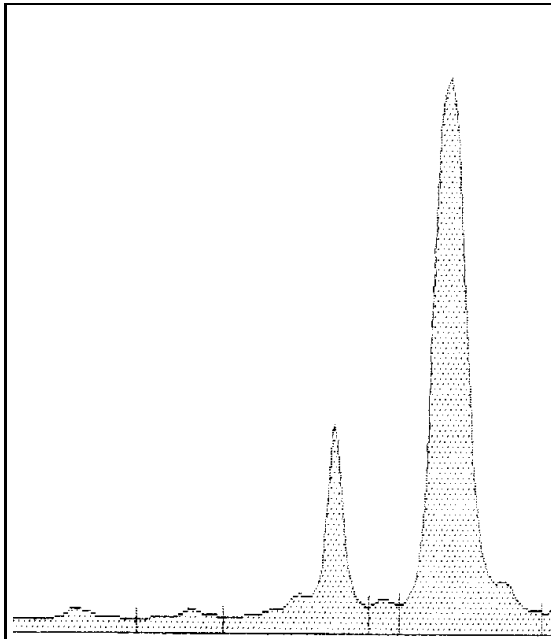
Bei Vergleich mit dem gleichzeitig mitgeführten iNOS-Standard zeigte sich jedoch eine Differenz in der Molekülgröße: Während die Standardproteinbande bei 130 kD lag, war das Protein aus den Granulozyten schon bei 100 kD nachzuweisen (siehe Abbildung 4.11(a)). Es konnte also nicht sicher gezeigt werden, daß das in den neutrophilen Granulozyten von Sepsispatienten nachzuweisende Protein mit spezifischen Antigeneigenschaften der iNOS tatsächlich mit der iNOS identisch oder eventuell ein Bruchstück davon ist. Bryant et al. [11] fanden in neutrophilen Granulozyten ein Enzym mit NOS-Aktivität und 130 kD Molekülgröße, isolierten gleichzeitig aber auch ein 22-kD-Protein. Da sie jedoch keine Identifizierung mittels Antikörperreaktion durchführten, konnte bei den hier gezeigten Blots möglicherweise das entsprechende Bruchstück mit iNOS-Antigeneigenschaften nachgewiesen werden. In den Arbeiten anderer Autoren war bisher keine iNOS-Expression in humanen neutrophilen Granulozyten nachgewiesen worden [93].

¹²Zusammensetzung siehe Abschnitt 3.5.1

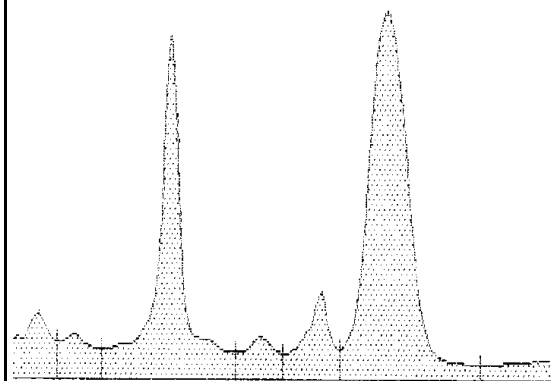
¹³beide von Transduction laboratories



(a) Belichteter Film eines Western-Blots mit neutrophilen Granulozyten (1. Bahn: 10 ng iNOS-Standard, 2. Bahn: neutrophile Granulozyten eines Sepsispatienten, 3. Bahn: neutrophile Granulozyten eines gesunden Probanden)



(b) Densitogramm der iNOS-Standardbahn (1. Bahn)



(c) Densitogramm der Granulozyten eines Sepsispatienten (2. Bahn)

Abbildung 4.11: Western-Blot-Analyse neutrophiler Granulozyten von Sepsispatienten

Es kann an dieser Stelle keine sichere Aussage über das Vorhandensein der iNOS in neutrophilen Granulozyten von Sepsispatienten getroffen werden. Da das nachgewiesene Protein mit iNOS-Antigenität ausschließlich in den Granulozyten der Sepsispatienten zu finden war, müßte nun durch Nachweis der iNOS-mRNA die Möglichkeit der iNOS-Expression in neutrophilen Granulozyten bei Sepsis geprüft werden.

4.3.4.3 Nachweis der NOS-Aktivität

Als Vergleichsgröße zur iNOS-Expression wurde die Aktivität des Enzyms in den isolierten neutrophilen Granulozyten bestimmt. Wie von Goode et al. [36] beschrieben, kommt es bei Sepsispatienten zu einer Erhöhung der NOS-Aktivität in diesen weißen Blutzellen. Ob diese Aktivitätssteigerung mit dem Ausmaß der möglichen Enzymexpression korreliert, sollte ein Untersuchungskriterium sein.

Material und Methoden: Die nach Vorschrift A.1 isolierten neutrophilen Granulozyten wurden in Protease-Inhibitor-Puffer nach Abschnitt 3.6.1 aufgenommen und in flüssigem Stickstoff eingefroren. Nach Verdünnung im gleichen Puffer wurden die Granulozyten mit einem Ultraschallstab lysiert (2×10 sec; ca. 0°C). Für die Aktivitätsmessung wurden $150 \mu\text{g}$ Protein je Inkubationsansatz eingesetzt. Die NOS-Aktivitätsbestimmung wurde nach der in Abschnitt 3.6.1 beschriebenen Methode ausgeführt.

Ergebnisse der Untersuchungen: Entgegen den Erwartungen einer erhöhten NOS-Aktivität in den neutrophilen Granulozyten der Sepsispatienten war die Aktivität gegenüber den Probanden der Kontrollgruppe erniedrigt. Die gemessenen Werte waren nur halb so hoch wie die der Kontrollzellen (siehe Abbildung 4.12).

Wie schon bei den immunstimulierten Ratten¹⁴ ist auch hier das Phänomen einer erniedrigten Aktivität der NO-Synthase in Zellen, die im Rahmen des Abwehrgeschehens aktiviert sind, zu finden. Es war sogar die Tendenz zu beobachten, daß die Granulozyten von Patienten mit sehr hohen Plasma-Nitratwerten die niedrigste NOS-Aktivität zeigten.

4.3.4.4 Diskussion

Durch die vergleichende Untersuchung der iNOS-Expression und -Aktivität in neutrophilen Granulozyten von Sepsispatienten sollte ein Beitrag zur Nachweis der Existenz

¹⁴vergleiche Abschnitt 3.7

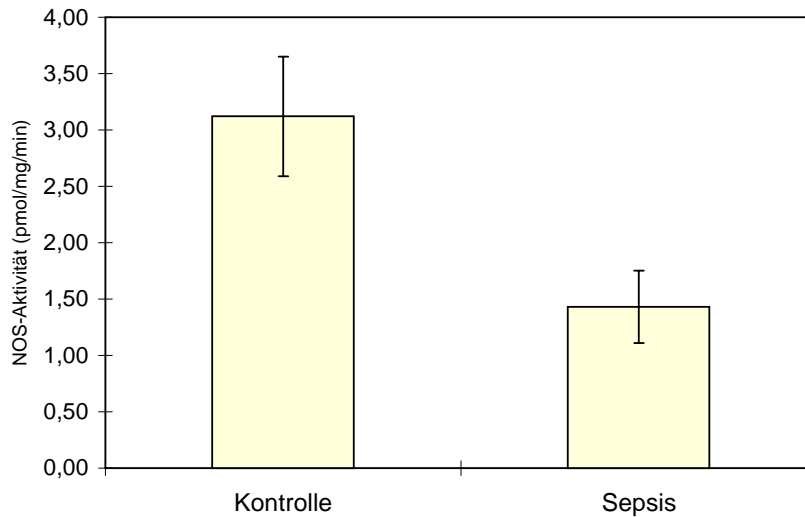


Abbildung 4.12: Vergleich der NOS-Aktivität in den neutrophilen Granulozyten von Kontrollprobanden und Sepsispatienten ($\pm s$)

dieses Enzyms in humanen weißen Blutzellen geleistet werden. Die hier gezeigten Ergebnisse lassen jedoch keine eindeutige Aussage zu, ob neutrophile Granulozyten des Menschen in extrem stimuliertem Zustand in der Lage sind, iNOS zu exprimieren, und damit einen Beitrag zur NO-Überproduktion beim Sepsissyndrom leisten.

Durch spezifische Antikörperreaktion konnte ein Protein detektiert werden, das trotz seines ausschließlichen Auftretens bei Sepsispatienten nicht eindeutig als iNOS ausgewiesen werden kann, da die Proteingröße kleiner als die der verwendeten vollständigen Standard-iNOS ist. Weil in den Neutrophilen der Sepsispatienten eine gegenüber der Kontrollsituation erniedrigte NO-Synthase-Aktivität gemessen werden konnte, ist die Folgerung möglich, daß dieses Protein ein inaktives Bruchstück der NO-Synthase darstellt. Die Untersuchung der neutrophilen Granulozyten bei Sepsis scheint jedoch ein Weg zu sein, der Aussagen zur Existenz der iNOS in humanen weißen Blutkörperchen ermöglicht, da die extreme Aktivierungssituation der Zellen mit einer iNOS-Induktion in Verbindung stehen kann.

Durch die Untersuchung von in das Gewebe eingewanderten Neutrophilen mit der damit verbundenen weiteren Aktivierung und durch den Vergleich der Ergebnisse mit der mRNA-Expression wären eindeutigere Ergebnisse zu erwarten. Außerdem ist es nötig, die NOS-Aktivitätsbestimmung an die Situation der aktivierten Immunabwehr anzupassen (siehe Diskussion des Abschnittes 3.7).

4.4 Zusammenfassung der Ergebnisse der Sepsisstudie

Ziel der Studie war die Quantifizierung der NO-Bildung beim Sepsissyndrom und eine vergleichende Untersuchung von Parametern, die mit dieser Reaktion des Immunsystems in Zusammenhang stehen. Die Messung von Zeitverläufen der NO-Bildung während des Verlaufes der Sepsis ermöglichte eine Ableitung des Einflusses von NO in den Sepsisphasen.

Die Stärke der NO-Produktion wurde durch die Quantifizierung der Nitratkonzentration im Plasma mittels der GC-MS-Methode erfaßt. Als Referenzmethode kam die Messung der Hydroxyarginin-Konzentration im Plasma zur Anwendung. Mit der Nitratquantifizierung wurde deutlich, daß die Sepsispatienten nach der Stärke der NO-Bildung unterschieden werden können. In der Studie zeigten 67% der Patienten mit Sepsissyndrom stark erhöhte Nitrat-Werte im Plasma, während es bei den restlichen Patienten nur zu geringfügiger Reaktion des NO-Stoffwechsels auf die Stimulation der Immunabwehr kam. Damit wurde gezeigt, daß die Erfüllung der Sepsiskriterien nicht automatisch mit einer überschießenden Stimulation des NO-Stoffwechsels verbunden ist, wie dies oft beschrieben wurde. Aus nicht eindeutig belegbaren Gründen ist bei einem Teil der Patienten die NO-Bildung wesentlich niedriger als dies bei den meisten Sepsis-Patienten beobachtet werden kann. Daran könnte die Art der Erreger einen Anteil haben, da Staphylokokken-Infektionen bei den Patienten mit gesteigerter NO-Produktion häufiger zu finden waren.

Wesentlich ist jedoch, daß nur die Quantifizierung der NO-Produktion das Entscheidungskriterium für den Einsatz von NO-Synthase-Hemmern zur Verhinderung der hypodynamen Sepsisphase und des septischen Schocks sein kann. Physiologische Parameter wie der Blutdruck und der Katecholamin-Bedarf korrelierten mit der Nitratkonzentration nur in der Sepsisgruppe, in der der NO-Stoffwechsel stimuliert war. In der Sepsisgruppe mit geringfügig verändertem NO-Haushalt war das klinische und physiologische Bild der Patienten jedoch ähnlich, auch wenn wenig NO gebildet wurde.

Die Messung der Hydroxyarginin-Konzentration im Plasma der Sepsispatienten als Referenzmethode zeigte eine Erhöhung dieses Parameters der NO-Produktion gegenüber den Normalwerten. Auch die Sepsispatienten mit niedriger Nitratkonzentration hatten erhöhte Hydroxyarginin-Werte. Dieser Parameter reflektiert eine gesteigerte NO-Bildung während der Sepsis, korreliert jedoch nicht mit der Nitratkonzentration. Ursache hierfür könnte die verringerte L-Arginin-Konzentration im Plasma der Intensivpatienten sein, an dessen Stelle das Biosynthese-Intermediat Hydroxyarginin als Substrat der NO-Biosynthese wiederverwertet werden kann. Da im Plasma der Sepsispatienten mit geringer Steigerung der Nitratkonzentration niedrigere L-Arginin-

Konzentrationen nachgewiesen wurden als bei der Sepsisgruppe 1, wäre der Mangel an NOS-Substrat eine weitere mögliche Erklärung für das Phänomen der Non-Responder.

Durch die Beobachtung des zeitlichen Verlaufes der NO-Biosynthese in der Sepsisgruppe 1 konnte gezeigt werden, daß die höchste NO-Produktion kurz vor Sepsisdiagnose bis 5 Tage nach erstmaliger Sepsisdiagnose stattfindet. Es konnte dagegen keine zeitliche Abfolge des Auftretens der maximalen NO-Bildung und des septischen Schocks nachgewiesen werden.

In Tabelle 4.5 sind die Ergebnisse der Sepsisstudie zusammengefaßt; die Ergebnisse der statistischen Analyse der erfaßten Werte sind in Tabelle 4.6 dargestellt.

Eine weitere Frage richtete sich auf die Nachweisbarkeit der iNOS-Expression und -Aktivität in neutrophilen Granulozyten von Sepsispatienten, da noch immer kein eindeutiger Nachweis des Vorhandenseins des Enzyms in diesen Zellen beim Menschen erfolgte. Durch Immunofluoreszenz-Analyse konnte eine spezifische Fluoreszenz im Zytosol der neutrophilen Granulozyten bei Sepsispatienten gezeigt werden. Nach Trennung der Proteine mittels SDS-PAGE konnte in Sepsis-Neutrophilen eine Proteinbande durch Antikörper detektiert werden, die nicht in den neutrophilen Granulozyten gesunder Probanden nachweisbar war. Die Molekülgröße dieses Proteins war mit ca. 100 kD jedoch kleiner als die der Standard-iNOS. Die starke Reaktion dieser Proteinbande mit zwei verschiedenen iNOS-Antikörpern läßt vermuten, daß es sich um ein Bruchstück der iNOS handelt. Durch Bestimmung der Aktivität der NO-Synthase in isolierten neutrophilen Granulozyten konnte dagegen *in vitro* eine verminderte Aktivität bei Sepsispatienten gefunden werden. Weitere Untersuchungen müssen zeigen, inwieweit das detektierte Protein Bruchstück der iNOS bei Sepsispatienten ist und wodurch der Nachweis einer verminderten Aktivität dieses Enzyms möglich ist, wenn die Nitratkonzentration *in vivo* eine Steigerung der NO-Biosynthese widerspiegelt.

Tabelle 4.5: Zusammengefaßte Werte der Sepsisstudie

Parameter		Kontrolle	Sepsis- gruppe 1	Sepsis- gruppe 2	Infektion
Nitrat ($\mu\text{mol/l}$)	\bar{x}	23,1	131,5	39,6	53,1
	s	5,2	56,0	6,9	15,2
	n	17	16	8	7
Hydroxyarginin ($\mu\text{mol/l}$)	\bar{x}	19,4	36,5	34,3	
	s	3,2	6,4	8,7	-
	n	17	4	2	
Arginin ($\mu\text{mol/l}$)	\bar{x}	126,1	64,6	20,1	
	s	23,1	17,8	2,1	-
	n	18	4	2	
MAP (mmHg)	\bar{x}	94,5*	67,6	70,9	79
	s	10,6	11,2	8,7	9,6
	n	12	14	8	7
Leukozyten ($\times 10^3/\mu\text{l}$)	\bar{x}	8,2*	16,2	18,55	11,5
	s	1,6	4,6	5,8	1,4
	n	12	15	8	7
CRP (mg/l)	\bar{x}	51,3*	113,4	137,0	105
	s	21,1	64,2	60,4	37,9
	n	15	15	8	7

\bar{x} : Mittelwerte der für die Patientengruppe charakteristischen Perioden; s: Standardabweichung; n: Patientenzahl; * die Kontrollwerte aus den infektionsfreien Intervallen der Sepsis- bzw. Infektions-Patienten wurden zusammengefaßt

Tabelle 4.6: Statistischer Vergleich der erfaßten Meßwerte der Patientengruppen mittels t-Test

	Kontr./ Sepsis	Kontr./ Sepsis 1	Kontr./ Sepsis 2	Kontr./ Infekt.	Sepsis 1/ Sepsis 2	Sepsis 1/ Infekt.	Sepsis 2/ Infekt.
Nitrat	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0005$	$p < 0,005$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	n
OH-Arg.	$p < 0,001$	$p < 0,05$	-	-	-	-	-
Arg.	$p < 0,0005$	$p < 0,005$	-	-	-	-	-
MAP	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,01$	n	$p < 0,05$	n
Leukos	$p < 0,0001$	$p < 0,0001$	$p < 0,005$	$p < 0,001$	n	$p < 0,005$	$p < 0,05$
CRP	$p < 0,0001$	$p < 0,005$	$p < 0,01$	$p < 0,05$	n	n	n

n: keine Signifikanz; - keine Werte vorhanden

5 Zusammenfassung

Aus der großen physiologischen Bedeutung, die NO im menschlichen Organismus zukommt, ergibt sich die Notwendigkeit, die Bildung dieses Radikals im gesunden Organismus und im pathophysiologischen Zusammenhang zu quantifizieren. Erst wenn die NO-Bildung in der konkreten physiologischen Situation nachvollziehbar ist, ist es möglich, medikamentös in das Geschehen einzugreifen. Ziel der Arbeit war der Vergleich von Quantifizierungsmethoden für in vivo gebildetes NO bzw. dessen Metabolisierungsprodukte und die Anwendung ausgewählter Methoden an einer klinisch relevanten Patientengruppe.

Dabei wurde deutlich, daß der Nachweis der NO-Bildung im Organismus in klinischen Patientenstudien nur auf indirektem Weg möglich ist. Von den untersuchten indirekten NO-Quantifizierungsmethoden haben sich für tierexperimentelle Studien folgende Methoden als nutzbar erwiesen: der ESR-spektroskopische HbNO-Nachweis und der Nitrat-Nachweis. Für Untersuchungen des Expressions- und Aktivierungsmechanismus sind die Western-Blot-Analyse und die NOS-Aktivitätsmessung einsetzbar. In Patientenstudien ist die Nitratquantifizierung die zu bevorzugende Methode, wenn ein nitrit- und nitratreduzierter Diätplan eingehalten werden kann und keine Untersuchung von Patienten mit hohen Dosierungen NO-freisetzender Arzneimittel erfolgt. Als ergänzendes Verfahren kann die Quantifizierung der N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Konzentration als Maß für die NO-Syntheserate erfolgen, wenn die L-Arginin-Konzentration im Plasma nicht erniedrigt ist.

Von den Methoden zur Quantifizierung von Nitrat ist in größeren klinischen Studien die Analyse mittels GC-MS am effektivsten anzuwenden. Ist die HPLC-Quantifizierungsmethode wegen des hohen Zeitaufwandes nur bei geringen Probenzahlen einsetzbar, so führt die Quantifizierung von Nitrit und Nitrat mittels Griess-Reaktion wegen der mangelhaften Wiederfindungsrate im Blutplasma nicht zu richtigen Ergebnissen. Außerdem ist durch die Anwendung der GC-MS-Methode zur Nitratquantifizierung die Analyse sehr geringer Probenvolumina um 5 μ l möglich. Dadurch können Erkenntnisse über die lokalen Verhältnisse der NO-Synthese gewonnen werden, was z. B. die Untersuchung ophthalmologischer Fragestellungen an Nagern ermöglicht.

Beim Vergleich der Nitratkonzentrationen in verschiedenen Körperflüssigkeiten immunstimulierter Nager war folgendes Ergebnis festzustellen: Die Nitratkonzentration im Augenkammerwasser immunstimulierter Ratten ist um den Faktor 1,5 höher als die im Blutplasma. Dieser Befund kann im Zusammenhang mit der Erkenntnis betrachtet werden, daß eine der ersten Reaktionen des Organismus auf Endotoxin-Gabe die Entwicklung einer Uveitis ist.

Durch die Anwendung ausgewählter NO-Quantifizierungsverfahren in einer Sepsisstudie waren weitere Aussagen zur Eignung der Methoden in der Praxis möglich. Außerdem wurden die Zusammenhänge zwischen NO-Bildung und veränderten klinischen Parametern untersucht.

Bei der Untersuchung von Sepsispatienten ist eine Erhöhung der NO-Syntheserate bei Erfüllung der Sepsiskriterien nach Bone mittels Nitrat- und N^{ω} -Hydroxy-L-arginin-Quantifizierung feststellbar. Bei 67% der untersuchten Sepsispatienten kann eine sechs- bis zehnfache Stimulierung der NO-Produktion nachgewiesen werden. Bei einem Teil der Patienten ist jedoch nur eine geringe Steigerung der NO-Bildung während der Sepsis festzustellen. Ein nachweisbarer Unterschied zwischen beiden Gruppen besteht in der Häufigkeit von Staphylokokken-Infektionen, die in der Gruppe mit stimulierter NO-Synthese fünfmal häufiger zu finden sind. Die Unterscheidung der Sepsispatienten nach der Stärke der NO-Stoffwechsel-Stimulierung ist Voraussetzung für den Einsatz von Medikamenten, die die NO-Synthasen hemmen.

Durch die Untersuchung der NO-Synthase-Expression und -Aktivität in den neutrophilen Granulozyten der Sepsispatienten sollte einerseits die Fähigkeit dieser Zellen zur NO-Bildung geklärt werden. Außerdem sollte ein Beitrag zur Klärung des Anteils dieser Blutzellen an der NO-Bildung während der Sepsis geleistet werden. In den neutrophilen Granulozyten von Sepsispatienten ist ein Protein nachweisbar, das bei einer Molekülgröße von etwa 100 kD Antigeneigenschaften der induzierbaren NO-Synthase besitzt. In den neutrophilen Granulozyten der Kontrollgruppe ist dieses Protein nicht nachweisbar. Es kann vermutet werden, daß es sich dabei um ein Bruchstück der iNOS handelt, die in den Neutrophilen der Sepsispatienten exprimiert wird.

Zusammenfassend konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, daß nur durch den Einsatz ausgewählter NO-Quantifizierungsmethoden in einer der Studie angepaßten Kombination Aussagen über den NO-Stoffwechsel möglich sind.

Anhang

Präparation der neutrophilen Granulozyten

Antikoagulatorisch behandeltes Vollblut (10 ml) wird mit Infukoll D 70 6%¹ (2,5 ml) in silikonisierten Glasröhrchen überschichtet und 20 min bei 37°C inkubiert. Der Plasmaüberstand wird dann über Ficoll-Paque[®] (3 ml)² geschichtet und bei 4 – 6°C 30 min mit 1250 U/min zentrifugiert. Das Sediment wird mit PBS³-Puffer gewaschen und 10 min mit 1000 U/min bei 4 – 6°C zentrifugiert. Zur Lyse der restlichen Erythrozyten wird das erhaltene Sediment mit 1 mmol/l PMSF⁴-haltigem Wasser (2 ml, 0°C) intensiv durchmischt. Nach 25 sec wird die Lyse mit 0,5 ml NaCl-Lösung (4,5%) gestoppt und die Zellsuspension 10 min mit 1000 U/min bei 4 – 6°C zentrifugiert. Abschließend wurden die Zellen zweimal mit PBS-Puffer gewaschen. Die resultierende Zellsuspension enthielt 98% neutrophile Granulozyten, deren Vitalität mit Trypanblau getestet wurde und bei 95% der Zellen nachgewiesen wurde.

¹Serum-Werk Bernburg AG

²Pharmacia LKB Biotechnology Uppsala/Sweden

³phosphate buffered saline, pH 7,4

⁴PMSF: Phenylmethansulfonsäurefluorid; Proteinase-Inhibitor; SIGMA chemicals

Abkürzungsverzeichnis

CPM	counts per minute
EDHF	endothelium-derived hyperpolarisation factor
EDRF	endothelium-derived relaxing factor
FAD	Flavin-Adenindinukleotid
FMN	Flavin-Mononukleotid
HbNO	Nitrosylhämoglobin
sGC	lösliche Guanylatcyclase
cGMP	cyclisches Guanosinmonophosphat
IHP	Inositolhexaphosphat
IL	Interleukin
kD	kilo Dalton; Molekulargewichts-Einheit
NADPH	reduziertes Nicotinsäureamid-Adenindinukleotid-Phosphat
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthasen
ecNOS	endotheliale konstitutive NO-Synthase
iNOS	induzierbare NO-Synthase
s	Standardabweichung
TGF	tumor growth factor

Literaturverzeichnis

- [1] AKAIKE, T., M. YOSHIDA, Y. MIYAMOTO, K. SATO, M. KOHNO, K. SASAMOTO, K. MIYAZAKI, S. UEDA und H. MAEDA: *Antagonistic action of imidazolinoxyl-N-oxides against endothelium-derived relaxing factor/NO through a radical reaction*. Biochem., (32):827–832, 1993.
- [2] ARCHER, S.: *Measurement of nitric oxide in biological models*. FASEB J., (7):349–360, 1993.
- [3] ARROYO, C. und M. KOHNO: *Difficulties encountered in the detection of nitric oxide (NO) by spin trapping techniques: A cautionary note*. Free Rad. Res. Commun., (14):145–155, 1991.
- [4] BECKMAN, J.S.: *The physiological and pathological chemistry of nitric oxide*. In: LANCASTER, J. [80].
- [5] BECKMAN, J.S., T.W. BECKMAN, J. CHEN, P.A. MARSHALL und B.A. FREEMAN: *Apparent hydroxyl radical production by peroxynitrite: Implications for endothelial injury from nitric oxide and superoxide*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (87):1620–1624, 1990.
- [6] BECKMAN, J.S., H. ISCHIROPOULOS, J. ZHU, M. VAN DER WOERD, C. SMITH, J. CHEN, J. HARRISON, J.C. MARTIN und M. ZSAI: *Kinetics of superoxide dismutase- and iron-catalyzed nitration of phenolics by peroxynitrite*. Arch. Biochem. Biophys., (298):438–445, 1992.
- [7] BONE, R.C.: *Definitions for sepsis and organ failure*. Crit. Care Med., (20):724–726, 1992.
- [8] BONE, R.C.: *Sepsis and its complications: The clinical problem*. Crit. care med., (22/7):S8–S11, 1994.
- [9] BONE, R.C., R.A. BALK, F.B. CERRA, R.P. DELLINGER, A.M. FEIN und W.A. KNAUS: *Definitions for sepsis and organ failure and guidelines for the use of innovative therapies in sepsis. The ACCP/SCCM Consensus Conference Committee*. Chest, (101):1644–1655, 1992.
- [10] BOOKE, M., F. HINDER, R. MCGUIRE, L. TRABER und D. TRABER: *Nitric oxide synthase inhibition versus norepinephrine for the treatment of hyperdynamic sepsis in sheep*. Crit. Care. Med., (24):835–844, 1996.
- [11] BRYANT, J.L., P. MEHTA, A. VON DER PORTEN und J.L. MEHTA: *Co-purification of 130 kD nitric oxide synthase and a 22 kD link protein from human neutrophils*. Biochem. Biophys. Res. Comm., (189/1):558–564, 1992.
- [12] BUCALA, R., K.J. TRADEY und CERAMI, A.: *Advanced glycosylation products quench nitric oxide and mediate defective endothelium-dependent vasodilatation in experimental diabetes*. J. Clin. Invest., (87):432–438, 1991.
- [13] BUSSE, R., I. FLEMING und V.B. SCHINI: *Nitric oxide formation in the vascular wall: Regulation and functional implications*. In: KOPROWSKI, H. und H. MAEDA [72].

- [14] BUSSE, R., TROGISCH G. und E. BASSENGE: *The role of endothelium in the control of vascular tone*. Basic. Res. Cardiol., (80):475–490, 1985.
- [15] BUTTERY, L.D.K., T.J. EVANS, D.R. SPRINGALL, A. CARPENTER, J. COHEN und J.M. POLAK: *Immunochemical localisation of inducible nitric oxide synthase in endotoxin treated rats*. Lab. Invest., (71/5):755–764, 1994.
- [16] CHO, H.J., Q.W. XIE, J. CALAYCAY, R.A. MUMFORD, K.M. SWIDEREK, T.D. LEE und C. NATHAN: *Calmodulin is a subunit of nitric oxide synthase from macrophages*. J. Exp. Med., (176):599–604, 1992.
- [17] COHEN, R.A.: *The role of nitric oxide and other endothelium-derived vasoactive substances in vascular disease*. Prog. Cardiovasc. dis., (XXXVIII/2):105–128, 1995.
- [18] CONRAD, K.P., G.M. JOFFE, H. KRUSZYNA, R. KRUSZYNA, L.G. ROCHELLE, R.P. SMITH, J.E. CHAVEZ und M.D. MOSHER: *Identification of increased nitric oxide biosynthesis during pregnancy in rats*. FASEB J., (7):566–571, 1993.
- [19] COOK, H.T., A.J. BUNE, A.S. JANSEN, G.M. TAYLOR, R.K. LOI und V. CATTELL: *Cellular localisation of inducible nitric oxide synthase in experimental endotoxic shock in the rat*. Clin. Sci., (87):179–186, 1994.
- [20] CORTAS, N.K. und N.W. WAKID: *Determination of inorganic nitrate in serum and urine by a kinetic cadmium-reduction method*. Clin. Chem., (36/8):1440–1443, 1990.
- [21] CORTAS, N.K. und N.W. WAKID: *Pharmacokinetic aspects of inorganic nitrate ingestion in man*. Pharmacol. Toxic., (68):192–195, 1991.
- [22] CROW, J.P., C. SPRUELL, J. CHEN, C. GUNN, H. ISCHIROPOULOS, M. TSAI, C.D. SMITH, R. RADI, W.H. KOPPENOL und J.S. BECKMAN: *On the pH-dependent yield of hydroxyl radical products from peroxynitrite*. Free Rad. Biol. Med., (16/3):331–338, 1994.
- [23] CURRAN, R.D., F.K. FERRARI, P.H. KISBERT, J. STADLER, D.J. STUEHR, R.L. SIMMONS und T.R. BILLIAR: *Nitric oxide and nitric oxide-generating compounds inhibit hepatocyte protein synthesis*. FASEB J., (5):2085, 1991.
- [24] DREXLER, H., A.M. ZEIHNER, K. MEINZER und H. JUST: *Correction of endothelial dysfunction in coronary microcirculation of hypercholesterolaemic patients by L-arginine*. Lancet, (338):1546–1550, 1991.
- [25] DUCHSTEIN, H.J. und S. RIEDERER: *Cytochrom P-450: Enzymsystem zu NO-Freisetzung*. Pharm. Ztg., (31):25–29, 1995.
- [26] ERIKSSON, L.E.G.: *Binding of nitric oxide to intact human erythrocytes as monitored by electron paramagnetic resonance*. Biochem. Biophys. Res. Commun., (203/1):176–181, 1994.
- [27] EVANS, T., A. CARPENTER, H. KINDERMAN und J. COHEN: *Evidence of increased nitric oxide production in patients with the sepsis syndrome*. Circulatory Shock, (41):77–81, 1993.
- [28] EVANS, T., A. CARPENTER, A. SILVA und J. COHEN: *Inhibition of nitric oxide synthase in experimental gram-negative sepsis*. J. Infect. Dis., (169):343–349, 1994.
- [29] FUKATSU, K., H. SAITO, R. FUKUSHIMA, T. INOUE, M. LIN, T. INABA und T. MUTO: *Detrimental effects of a nitric oxide synthase inhibitor N^ω-Nitro-L-arginine-methylester in a murine sepsis model*. Arch. Surg., (130):410–414, 1995.

- [30] FÜLLE, H.J. und D.L. GARBERS: *Guanylyl cyclases: a family of receptor linked enzymes*. Cell biochem. funkt., (12):157–165, 1994.
- [31] FURCHGOTT, R.F. und J.V. ZAWADZKI: *The obligatory role of endothelial cells in the relaxation of arterial smooth muscle by acetylcholin*. Nature, (288):373–376, 1980.
- [32] GHOSH, D.K., H.M. ABU-SOUD und D.J. STUEHR: *Reconstitution of the second step in NO synthesis using the isolated oxygenase and reductase domains of macrophage NO synthase*. Biochem., (34):1316–1320, 1995.
- [33] GILLIAM, M., M.P. SHERMAN, J.M. GRISCAVAGE und L.J. IGNARRO: *A spectrophotometric assay for nitrate using NADPH oxidation by aspergillus nitrate reductase*. Anal. Biochem., (212):59–65, 1993.
- [34] GOMÉZ-JIMÉNEZ, J., A. SALGADO, M. MOURELLE, M.C. MARTIN, R.M. SEGURA, R. PERACAUULA und S. MONCADA: *L-Arginine : nitric oxide pathway in endotoxemia and human septic shock*. Crit. Care Med., (23/2):253–257, 1995.
- [35] GONZALEZ-ZULUETA, M.: *Role of nitric oxide in cell death*. Futura, (12/1):1–10, 1997.
- [36] GOODE, H.F., P.D. HOWDLE, B.E. WALKER und N.R. WEBSTER: *Nitric oxide synthase activity is increased in patients with sepsis syndrome*. Clin. Sci., (88):131–133, 1995.
- [37] GOODE, H.F., N.R. WEBSTER, P.D. HOWDLE und B.E. WALKER: *Nitric oxide production by peripheral blood polymorphonuclear leukocytes*. Clin. Sci., (86):411–415, 1994.
- [38] GREEN, D.L., D.A. RUIZ DE LUZURIAGA K.AND WAGNER, W. RAND, N. ISTFAN, V.R. YOUNG, und S.R. TANNENBAUM: *Nitrate biosynthesis in man*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (78):7764–7768, 1981.
- [39] GREEN, L.C., D.A. WAGNER, J. GLOGOWSKI, P.L. SKIPPER, J.S. WISHNOK und S.R. TANNENBAUM: *Analysis of nitrate, nitrite, and [15N]-nitrate in biological fluids*. Anal. Biochem., (126):131–138, 1982.
- [40] GRIFFITH, O.W. und D.J. STUEHR: *Nitric oxide synthases: properties and catalytic mechanism*. Ann. Rev. Physiol., (57):707–736, 1995.
- [41] GRISCAVAGE, J.M., N.E. ROGERS, M.P. SHERMAN und L.J. IGNARRO: *Inducible nitric oxide synthase from a rat alveolar macrophage cell line is inhibited by nitric oxide*. J. Immunol., (151/11):6329–6337, 1993.
- [42] GRISCAVAGE, J.M., S. WILK und L.J. IGNARRO: *Inhibitors of the proteasome pathway interfere with induction of nitric oxide synthase in macrophages by blocking activation of transcription factor NF-kB*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (93):3308–3312, 1996.
- [43] GUSTAFSSON, L.E., A.M. LEONE, M.G. PERSSON, N.P. WIKLUND und S. MONCADA: *Endogenous nitric oxide is present in the exhaled air of rabbits, guinea pigs and humans*. Biochem. Biophys. Res. Comm., (181/2):852–857, 1991.
- [44] HAAGEN, S., A.J. SMIT, M.F. BURNEL und J. HARA: *Nitrogen oxide content of smoke from different types of tobacco*. Arch. Ind. Health., (20):399–400, 1959.
- [45] HARRISON, D.J., M.A. KURZ, J.E. QUILLEN, F.W. SEELKE und A. MÜGGE: *Normal and pathophysiologic considerations of endothelial regulation of vascular tone and their relevance to nitrate therapy*. Am. J. Cardiol., (70):B11–B17, 1992.

- [46] HECKER, M., CH. SCHOTT, B. BUCHER, R. BUSSE und J.C. STOCLET: *Increase in serum Ng-hydroxy-L-arginine in rats treated with bacterial lipopolysaccharide*. Europ. J. Pharmacol., (275):R1–R3, 1995.
- [47] HECKER, M., W.C. SESSA, H.J. HARRIS, E.E. ÄNGGÅRD und J.R. VANE: *The metabolism of L-arginine and its significance for the biosynthesis of endothelium-derived relaxing factor: cultured endothelial cells recycle L-citrulline to L-arginine*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (97):8612–8616, 1990.
- [48] HENRY, Y. und R. BANERJEE: *Electron paramagnetic studies of nitric oxide haemoglobin derivatives: isolated subunits and nitric oxide hybrids*. J. Mol. Biol., (73):469–482, 1973.
- [49] HENRY, Y., C. DUCROCQ, J.C. DRAPIER, D. SERVENT, C. PELLAT und A. GUISSANI: *Nitric oxide, a biological effector - Electron paramagnetic resonance detection of nitrosyl-iron-protein complexes in whole cells*. Eur. Biophys. J., (20):1–15, 1991.
- [50] HENRY, Y., M. LEPOIVRE, J.-C. DRAPIER, C. DUCROCQ, J.-L. BOUCHER und A. GUISSANI: *EPR-characterisation of molecular targets for NO in mammalian cells and organelles*. FASEB J., (7):1124–1134, 1993.
- [51] HESSE, D.G., K.J. TRACEY, Y. FONG, K.R. MANOGUE, M.A. PALLADINO und A. CERAMI: *Cytokine appearance in human endotoxemia and primate bacteremia*. Surg. Gynecol. Obstet., (166):147–153, 1988.
- [52] HILLE, R., J.S. OLSON und G. PALMER: *Spectral transition of nitrosyl hemes during ligand binding to hemoglobin*. J. Biol. Chem., (254/23):12110–12120, 1979.
- [53] HOFFNER, U., C. BOULANGER und P.M. VANHOUTTE: *Proximal and distal dog coronary arteries respond differently to basal EDRF but not to NO*. Am. J. Physiol., (256):H828–H831, 1989.
- [54] HÜTTERMANN, J., C. BURGARD und R. KAPPL: *Proton ENDOR from randomly oriented NO-ligated haemoglobin: Approaching the structural basis for the R-T transition*. J. Chem. Soc. Farad. Trans., (90/20):3077–3087, 1994.
- [55] ICHIMORI, K., H. ISHIDA, M. FUKAHORI, H. NAKAZAWA und E. MURAKAMI: *Practical nitric oxide measurement employing a nitric oxide-selective electrode*. Rev. Sci. Instrum., (65/8):2714–2718, 1994.
- [56] IGNARRO, L.J.: *Endothelium-derived nitric oxide: Actions and properties*. FASEB J., (3):31–36, 1989.
- [57] IGNARRO, L.J.: *Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide*. Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., (30):535–560, 1990.
- [58] IGNARRO, L.J.: *Nitric oxide – a novel transduction mechanism for transcellular communication*. Hypertens., (16):477–483, 1990.
- [59] IGNARRO, L.J.: *Nitric oxide as a communication signal in vascular and neuronal cells*. In: LANCASTER, J. [80].
- [60] IYENGAR, R., D.J. STUEHR und M.A. MARLETTA: *Macrophage synthesis of nitrate, nitrite, and N-nitrosamines: precursor and role of the respiratory burst*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (84):6369–6373, 1987.

- [61] JACOB, T., J.B. OCHOA, A.O. UDEKWU, J. WILKINSON, T. MURRAY, T.R. BILLIAR, R.L. SIMMONS, D.W. MARION und PEITZMAN A.B.: *Nitric oxide production is inhibited in trauma patients*. J. Traum., (35/4):590–597, 1993.
- [62] JOLY, G.A., M. AYRES, F. CHELLY und R.G. KILBOURN: *Effects of NG-methyl-L-arginine, N^G-nitro-L-arginine and aminoguanidine on constitutive and inducible nitric oxide synthase in rat aorta*. Biochem. Biophys. Res. Comm., (199/1):147–154, 1994.
- [63] KAPPL, R. und J. HÜTTERMANN: *Heme – globin interactions in nitrosyl-ligated hemoglobin as probed by ENDOR spectroscopy*. In: HOFF V. (Herausgeber): *Advanced EPR in biology and biochemistry*, Seiten 501–540. Elsevier, 1989.
- [64] KAUR, H. und B. HALLIWELL: *Evidence for nitric oxide-mediated damage in chronic inflammation. Nitrotyrosine in serum and synovial fluid from rheumatoid patients*. FEBS-Lett., (350):9–12, 1994.
- [65] KELM, M., M. FEELISCH, R. SPAHR, H.M. PIPER, E. NOACK und J. SCHRADER: *Quantitative and kinetic characterisation of nitric oxide and ERDF released from cultured endothelial cells*. Biochem. Biophys. Res. Comm., (154/1):236–244, 1988.
- [66] KLABUNDE, R.E. und A.F. COSTON: *Nitric oxide synthase inhibition does not prevent cardiac depression in endotoxic shock*. Shock, (3/1):73–78, 1995.
- [67] KLATT, P., M. SCHMID, E. LEOPOLD, K. SCHMIDT, E.R. WERNER und B. MAYER: *The pteridine binding site of brain nitric oxide synthase*. J. Biol. Chem., (269/19):13861–13866, 1994.
- [68] KLIMM, J., T. BEIN, D. FRÖHLICH und K. TAEGER: *Stickstoffmonoxid (NO) – physiologische und biochemische Bedeutung*. Anaest. Intensivmed., (5):115–123, 1992.
- [69] KOLB, H., U. KIESEL, K.D. KRONCKE und V. KOLB-BACHOFEN: *Suppression of low-dose streptozotocin-induced diabetes in mice by administration of a nitric oxide synthase inhibitor*. Life sci., (49):PL213–PL217, 1991.
- [70] KON, H.: *Paramagnetic resonance study of nitric oxide hemoglobin*. J. Biol. Chem., (243/16):4350–4357, 1968.
- [71] KONOREV, E.A., M.M. TARPEY, J. JOSEPH, J.E. BAKER und B. KALYANARAMAN: *Nitronyl nitroxides as probes to study the mechanism of vasodilatory action of nitrovasodilators, nitron spin traps, and nitroxides: role of nitric oxide*. Free Rad. Biol. Med., (18/2):169–177, 1995.
- [72] KOPROWSKI, H. und H. MAEDA (Herausgeber): *The role of nitric oxide in physiology and pathophysiology*, Berlin, Heidelberg, 1995. Springer-Verlag.
- [73] KORTH, H.-G., R. SUSTMANN, C. THATER, A.R. BUTLER und K.U. INGOLD: *On the mechanism of the nitric oxide synthase-catalysed conversion of N^w-Hydroxy-L-arginine to citrulline and nitric oxide*. J. Biol. Chem., (269/27):17776–17779, 1994.
- [74] KOSAKA, H. und T. SHIGA ET AL: *ESR spectral transition by arteriovenous cycle in nitric oxide hemoglobin of cytokine-treated rats*. Am. J. Physiol., (266):C1400–C1405, 1994.
- [75] KOSAKA, H. und K. TYUMA, I. IMAIZUMI: *Mechanism of autocatalytic oxidation of oxyhemoglobin by nitrite*. Biomed. Biochim. Acta, (42):144–148, 1983.

- [76] KRUSZYNA, R., H. KRUSZYNA, R.P. SMITH, C.D. THRON und D.E. WILCOX: *Nitrite conversion to nitric oxide in red blood cells and its stabilisation as a nitrosylated valency hybrid of hemoglobin*. J. Pharmacol. Exp. Ther., (241/1):307–313, 1987.
- [77] KUBES, P., S. KANWAR, X. NIU und J.P. GABOURY: *Nitric oxide synthesis inhibition induces leukocyte adhesion via superoxide and mast cells*. FASEB J., (7):1293–1299, 1993.
- [78] KUBES, P., M. SUZUKI und D.N. GRANGER: *Nitric oxide: an endogenous modulator of leukocyte adhesion*. Proc. Natl. Acad. Sci., (88):4651–4655, 1991.
- [79] KUBRINA, L.N., W.S. CALDWELL, P.I. MORDVINTCEV, I.V. MALENKOVA und A.F. VANIN: *EPR evidence for nitric oxide production from guanidino nitrogens of L-arginine in animal tissues in vivo*. Biochim. Biophys. Acta, (1099):233–237, 1992.
- [80] LANCASTER, J. (Herausgeber): *Nitric oxide. Principles and actions.*, San Diego, London, 1996. Academic press, inc.
- [81] LANDIN, L., J.A. LORENTE, E. RENES, P. CANAS, P. JORGE und D. LISTE: *Inhibition of nitric oxide synthesis improves the vasoconstrictive effect of noradrenaline in sepsis*. Chest, (106/1):250–256, 1994.
- [82] LIU, J. und W.C. SESSA: *Identification of covalently bound amino-terminal myristic acid in endothelial nitric oxide synthase*. J. Biol. Chem., (269/16):11691–11694, 1994.
- [83] LOWENSTEIN, C.J., J.L. DINERMAN und S.H. SNYDER: *Nitric oxide: a physiologic messenger*. Ann. Intern. Med., (120):227–237, 1994.
- [84] MACMICKING, J.D., C. NATHAN, G. HOM, N. CHARTRAIN, D.S. FLETCHER, M. TRUMBAUER, K. STEVENS, Q. XIE, K. SOKOL, N. HUTCHINSON, H. CHEN und J.S. MUDGETT: *Altered responses to bacterial infection and endotoxic shock in mice lacking inducible nitric oxide synthase*. Cell, (81):641–650, 1995.
- [85] MALINSKI, T. und Z. TAHA: *Nitric oxide release from a single cell measured in situ by a porphyrinic-based microsensor*. Nature, (358):676–678, 1992.
- [86] MARLETTA, M.A.: *Nitric oxide synthase structure and mechanism*. J. Biol. Chem., (268/17):12231–12234, 1993.
- [87] MARLETTA, M.A., P.S. YOON, R. IYENGAR, C.D. LEAF und J.S. WISHNOK: *Macrophage oxidation of L-arginine to nitrite and nitrate: nitric oxide is an intermediate*. Biochem., (27):8706–8711, 1988.
- [88] MAYER, B., F. BRUNNER und K. SCHMIDT: *Inhibition of nitric oxide synthesis by methylene blue*. Biochem. Pharmacol., (45/2):367–374, 1993.
- [89] MCCALL, T.B., N.K. BOUGHTON-SMITH, R.M.J. PALMER, B.J.R. WHITTLE und S. MONCADA: *Synthesis of nitric oxide from L-arginine by neutrophils*. Biochem. J., (261):293–296, 1989.
- [90] MCCALL, T.B., R.M.J. PALMER und S. MONCADA: *Induction of nitric oxide synthase in rat peritoneal neutrophils and its inhibition by dexamethasone*. Eur. J. Immunol., (21):2523–2527, 1991.
- [91] MEHTA, J.L., L.Y. CHEN, B.C. KONE, P. MEHTA und P. TURNER: *Identification of constitutive and inducible forms of nitric oxide synthase in human platelets*. J. Lab. Clin. Med., (125):370–377, 1995.

- [92] MEYER, J., N. RICHTER und M. HECKER: *High-performance liquid chromatographic determination of nitric oxide synthase-related arginine derivatives in vitro and in vivo*. Anal. Biochem., (247/1):11–16, 1997.
- [93] MILES, A.M., M.W. OWENS, S. MILLIGAN, G.G. JOHNSON, J.Z. FIELDS, T.S. ING, V. KOTTAPALLI, A. KESHAVARZIAN und M.B. GRISHAM: *Nitric oxide synthase in circulating vs. extravasated polymorphonuclear leukocytes*. J. Leuk. Biol., (58):616–622, 1995.
- [94] MONCADA, S., R.M.J. PALMER und E.A. HIGGS: *Nitric oxide: Physiology, Pathophysiology, and Pharmacology*. Pharmacological Rev., (43/2):109–142, 1991.
- [95] MORDVINTCEV, P., A. MÜLSCH, R. BUSSE und A. VANIN: *On-line detection of nitric oxide formation in liquid aqueous phase by electron paramagnetic resonance spectroscopy*. Anal. Biochem., (199):142–146, 1991.
- [96] MORRIS, R., E. SOUTHAM, D.J. BRAID und J. GARTHWAITE: *Nitric oxide may act as a messenger between dorsal root ganglion neurones and their satellite cells*. Neurosci. Lett., (137):29–32, 1992.
- [97] MORRIS, S.M. und BILLIAR T.R.: *New insights into the regulation of inducible nitric oxide synthesis*. Am. J. Physiol., (266):E829–E839, 1994.
- [98] MOSHAGE, H., B. KOK, R. HUIZENGA und P.L.M. JANSEN: *Nitrite and nitrate determinations in plasma: a critical evaluation*. Clin. Chem., (41/6):892–896, 1995.
- [99] MÜLSCH, A., P. MORDVINTCEV und A. VANIN: *Quantification of nitric oxide in biological samples by electron spin resonance spectroscopy*. Neuroprotoc., (1/2):165–173, 1992.
- [100] NATHAN, C.: *Nitric oxide as a secretory product of mammalian cells*. FASEB J., (6):3051–3064, 1992.
- [101] NATHAN, C.: *Inducible nitric oxide synthase: regulation subserves function*. In: KOPROWSKI, H. und H. MAEDA [72].
- [102] NATHAN, C. und Q. XIE: *Regulation of biosynthesis of nitric oxide*. J. Biol. Chem., (269/19):13725–13728, 1994.
- [103] NAVA, E., R.M. PALMER und S. MONCADA: *Inhibition of nitric oxide synthesis in septic shock: how much is beneficial*. Lancet, (338):1555–1557, 1991.
- [104] NEILLY, I.J., M. COPLAND, M. HAJ, G. ADEY, N. BENJAMIN und B. BENNETT: *Plasma nitrate concentrations in neutropenic and non-neutropenic patients with suspected septicemia*. J. Haematol., (89):199–202, 1995.
- [105] NÜSSLER, A.K.: *Stickstoffmonoxid/nitric oxide: ein biologischer Tausendsassa*. Pharm. Ztg., (141/2):11–20, 1996.
- [106] OCHOA, J.B. UDEKWU, A.O., T.R. BILLIAR, R.D. CURRAN, F.B. CERRA, R.L. SIMMONS und A.B. PEITZMAN: *Nitrogen oxide levels in patients after trauma and during sepsis*. Ann. Surg., (214/5):621–626, 1991.
- [107] PERUTZ, M.F., J.V. KILMARTIN, K. NAGAI, A. SZABO und S.R. SIMON: *Influence of globin structures on the state of heme. Ferrous low spin derivatives*. Biochem., (15):378–387, 1976.
- [108] PETROS, A., D. BENNETT und P. VALLANCE: *Effect of nitric oxide synthase inhibitors on hypotension in patients with septic shock*. Lancet, (338):1557–1558, 1991.

- [109] PETROS, A., G. LAMB, A. LEONE, S. MONCADA, D. BENNETT und P. VALLANCE: *Effects of a nitric oxide synthase inhibitor in humans with septic shock*. Cardiovasc. Res., (28):34–39, 1994.
- [110] PRÓNAI, L., K. ICHIMORI, H. NOZAKI, H. NAKAZAWA, H. OKINO, A.J. CARMICHAEL und C.M. ARROYO: *Investigation of the existence and biological role of L-arginine/nitric oxide pathway in human platelets by spin-trapping/EPR studies*. Eur. J. Biochem., (202):923–930, 1991.
- [111] PRYOR, W.A. und G.L. SQUADRITO: *The chemistry of peroxynitrite: a product from the reaction of nitric oxide with superoxide*. Am. J. Physiol., (268):L699–L722, 1995.
- [112] PUFAHL, R.A., J.S WISHNOK und M.A. MARLETTA: *Hydrogen peroxide-supported oxidation of N^G-Hydroxy-L-arginine by nitric oxide synthase*. Biochem., (34):1930–1941, 1995.
- [113] PULATOVA, M.K., G.T. RICHEREVA und S.W. KUROPTEVA: *Elektrony paramagnetny resonanz v molekularnoy radiobiology (russ.)*. Energieatomisdat, Moskau, 1989.
- [114] RADOMSKI, M.W., R.M. PALMER und S. MONCADA: *An L-arginine/nitric oxide pathway present in human platelets regulates aggregation*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, (87):5193, 1990.
- [115] RADOMSKI, M.W., G. VALLANCE, P. WHITLEY, N. FOXWELL und S. MONCADA: *Platelet adhesion to human vascular endothelium is modulated by constitutive and cytokine induced nitric oxide*. Cardiovasc. Res., (27):1380–1382, 1993.
- [116] REIN, H., O. RISTAU, G. JÄNIG und F. JUNG: *On the influence of ATP on the electron paramagnetic resonance spectrum of methemoglobin*. FEBS Lett., (15/1):21–23, 1971.
- [117] ROSSAINT, R., K.J. FALKE, F. LOPEZ, K. SLAMA, U. PISON und W.M. ZAPOL: *Inhaled nitric oxide for the adult respiratory distress syndrome*. N. Engl. J. Med., (328):431–432, 1993.
- [118] SALTER, M., R.G. KNOWLES und S. MONCADA: *Widespread tissue distribution, species distribution and changes in activity of Ca²⁺-dependent and Ca²⁺-independent nitric oxide synthases*. FEBS-Lett., (291/1):145–149, 1991.
- [119] SANCHES, R.: *Dehydration effects on the heme environment of nitric oxide hemoglobin*. Biochim. Biophys. Acta, (955):310–314, 1988.
- [120] SAX, H.C., P.-O. HASSELGREN, M.A. TALAMINI, L.L. EDWARDS und J.E. FISCHER: *Amino acid uptake in isolated, perfused liver: effect of trauma and sepsis*. J. Surg. Res., (45):50–55, 1988.
- [121] SCHOTT, C.A., C.M. BOGEN, P. VETROVSKY, C.C. BERTON und J.C. STOCLET: *Exogenous N^G-hydroxy-L-arginine causes nitrite production in vascular smooth muscle cells in the absence of nitric oxide synthase activity*. FEBS-Lett., (341):203–207, 1994.
- [122] SCHUSTER, H.P.: *Definition und Diagnose von Sepsis und Multiorganversagen*. In: *Intensivtherapie bei Sepsis und Multiorganversagen*, Seiten 3–18. Springer, Berlin, 1993.
- [123] SESSA, W.C.: *The nitric oxide synthase family of proteins*. J. Vasc. Res., (31):131–143, 1994.
- [124] SIGMON, D.H., O.A. CARRETERO und W.H. BEIERWALTES: *Endothelium-derived relaxing factor regulates renin release in vivo*. Am. J. Physiol., (263):F256–F261, 1992.

- [125] SPITZER, J.A., P. ZHANG und A.M.S. MAYER: *Functional characterisation of peripheral circulating and liver recruited neutrophils in endotoxic rats.* J. Leuk. Biol., (56):166–173, 1994.
- [126] STAMLER, J.S.: *S-Nitrosothiols and the bioregulatory actions of nitrogen oxides through reactions with thiol groups.* In: KOPROWSKI, H. und H. MAEDA [72].
- [127] STAR, R.A.: *Southwestern internal medicine conference: Nitric oxide.* Am. J. Med. Sci., (306/5):348–358, 1993.
- [128] STUEHR, D.J., S.K. NYOUN, C.F. NATHAN, O.W. GRIFFITH, P.L. FELDMAN und J. WISEMAN: *N*-Hydroxy-L-arginine is an intermediate in the biosynthesis of nitric oxide from L-arginine.* J. Biol. Chem., (266/10):6259–6263, 1991.
- [129] SWARTZ, H.M., J.R. BOLTON und D.C. BORG (Herausgeber): *Biological applications of electron spin resonance.* Wiley-Interscience, New York, 1972.
- [130] SZABO, A. und M.F. PERUTZ: *Equilibrium between six- and five-coordinated hemes in nitrosyl-hemoglobin: Interpretation of electron spin resonance spectra.* Biochem., (15/20):4427–4428, 1976.
- [131] SZABO, C., A.J. MITCHELL, C. THIEMERMANN und J.R. VANE: *Nitric oxide-mediated hyporeactivity to noradrenaline precedes the induction of nitric oxide synthase in endotoxin shock.* Br. J. Pharmacol., (108):786–792, 1993.
- [132] TILTON, R.G., K. CHANG, J.A. CORBETT, T.P. MISKO, M.G. CURRIE, N.S. BORA, H.J. KAPLAN und J.R. WILLIAMSON: *Endotoxin-induced uveitis in the rat is attenuated by inhibition of nitric oxide production.* Invest. Ophthalmol. Vis. Sci., (35):3278–3288, 1994.
- [133] TRACEY, W.R., J. LINDEN, M.J. PEACH und R.A. JOHNS: *Comparison of spectrophotometric and biological assays for nitric oxide (NO) and endothelium-derived relaxing factor (EDRF): Nonspecificity of the diazotation reaction for NO and failure to detect EDRF.* J. Pharmacol. Exp. Ther., (252/3):922–928, 1990.
- [134] VAN DER VLIET, A., D. SMITH, C.A. O NEILL, H. KAUR, V. DARLEY-USMAR, C.E. CROSS und B. HALLIWELL: *Interactions of peroxynitrite with human plasma and its constituents: oxidative damage and antioxidant depletion.* Biochem. J., (303):295–301, 1994.
- [135] VAN ZEE, K.J., L.E. DE FORGE und E. FISCHER: *IL-8 in septic shock, endotoxemia, and after IL-1 administration.* J. Immunol., (148):1746–1752, 1991.
- [136] WANG, P., Z.F. BA und I.H. CHAUDRY: *Nitric oxide - to block or enhance its production during sepsis?* Arch. Surg., (129):1137–1143, 1994.
- [137] WENNMALM, Å., G. BENTHIN, A. EDLUND, L. JUNGERSTEN, N. KIELER-JENSEN, S. LUNDIN, U. NATHORST-WESTFELT, A.S. PETERSSON und F. WAAGSTEIN: *Metabolism and excretion of nitric oxide in humans - an experimental and clinical study.* Circ. Res., (73):1121, 1993.
- [138] WENNMALM, Å., G. BENTHIN und A.S. PETERSSON: *Dependence of the metabolism of nitric oxide (NO) in healthy human whole blood on the oxygenation of its red cell hemoglobin.* Br. J. Pharmacol., (106):507–508, 1992.

- [139] WENNMALM, Å., B. LÄNNE und A.S. PETERSSON: *Detection of endothelial-derived relaxing factor in human plasma in the basal state and following ischemia using electron paramagnetic resonance spectrometry*. Anal. Biochem., (187/2):359–363, 1990.
- [140] WERTZ, J.E. und J.R. BOLTON (Herausgeber): *Electron spin resonance, elementary theory and practical applications*. McGraw-Hill, New York, 1972.
- [141] WHITE, F.M.: *The transport of cationic amino acids across the plasma membrane of mammalian cells*. Biochim. Biophys. Act., (822):355–374, 1985.
- [142] WONG, H.R., J.A. CARCILLO, G. BURCKART, N. SHAH und J.E. JANOSKY: *Increased serum nitrite and nitrate concentrations in children with the sepsis syndrome*. Crit. care med., (23/5):835–842, 1995.
- [143] WRIGHT, C.D., A. MÜLSCH, R. BUSSE und H. OSSWALD: *Generation of nitric oxide by human neutrophils*. Biochem. Biophys. Res. Comm., (160/2):813–819, 1989.
- [144] YOSHIDA, K., K. KASAMA, M. KITABATAKE, M. OKUDA und M. IMAI: *Metabolic fate of nitric oxide*. Int. Arch. occup. environ. health., (46):71–77, 1980.
- [145] YUI, Y., R. HATTORI, K. KOSUGA, H. EIZAWA, K. HIKI, S. OHKAWA, K. OHNISHI, S. TERAOKA und C. KAWAI: *Calmodulin-independent nitric oxide synthase from rat polymorphonuclear neutrophils*. J. Biol. Chem., (266/6):3369–3371, 1991.
- [146] ZAFIRIOU, O.C. und M. MCFARLAND: *Determination of trace levels of nitric oxide in aqueous solution*. Anal. Chem., (52):1662–1667, 1980.

Nachwort

An dieser Stelle soll allen gedankt sein, durch deren Unterstützung und Kooperation diese Arbeit ermöglicht wurde:

Prof. Dr. I. Schimke am Universitätsklinikum Charité, Med. Klinik und Poliklinik I, Leiter der Arbeitsgruppe Medizinische Chemie und Pathobiochemie für die theoretische und praktische Betreuung und seinen Einsatz bei der Ermöglichung von Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen der Charité,

Dr. Annekathrin Haberland und Dipl. chem. Katrin Neubert für geduldige Diskussionen, Ansporn und die enge Zusammenarbeit; Frau Kruse, Frau Möckel und Frau Noack für die praktische Unterstützung bei der Arbeit im Labor für Medizinische Chemie und Pathobiochemie,

Prof. Dr. Borchert am Institut für Pharmazie der HUB für die wohlwollende Begleitung des Arbeitsprozesses,

Prof. Å. Wennmalm für die herzliche Aufnahme am Institut für Klinische Physiologie des Sahlgrenska-Krankenhauses der Universität Göteborg (Schweden) und allen Mitarbeitern des Göteborger Institutes, insbesondere Ann-Sofi Petersson, Günther Benthin sowie Augustinas Sakinis, aber auch Åsa Ringquist, Lennart Jungersten und Chiharu Doi für die enge und produktive Zusammenarbeit, durch die ein großer Teil der Arbeit ermöglicht wurde,

Prof. Dr. M. Hecker und Jens Meyer am Zentrum für Physiologie des Klinikums der J.W.-Goethe-Universität Frankfurt am Main unter Leitung von Prof. Dr. Busse für die freundliche Betreuung und gute Zusammenarbeit bei der Bestimmung der Hydroxyarginin-Konzentration,

Prof. Dr. R. Stößer, Dr. Sven Sebastian, Dr. Michael Päch aus der ESR-Arbeitsgruppe am Institut für Chemie der HUB für die theoretische und praktische Unterstützung bei den ESR-spektroskopischen Arbeiten, die auch durch die Initiative und Einführung von Dr. K. Mäder (Institut für Pharmazie der HUB) möglich wurden,

Dipl. med. U. Rohr, OA Dr. H. Wauer, Dr. Dr. K. Egerer, Prof. Dr. W. Kox von der Klinik für Anaesthesiologie und Intensivtherapie der Charité für die enge Kooperation, durch die die Sepsisstudie ermöglicht wurde,

Chefarzt PD Dr. Scheffartzik vom Unfallkrankenhaus Berlin für wertvolle Hinweise zur Sepsisstudie,

Dr. H. Baatz aus der Augenklinik der Charité für die freundliche Unterstützung bei einem Teil der Tierexperimente

und nicht zuletzt meinen Eltern für ihre Unterstützung meines Vorhabens.

Michael Weber danke ich für seine ständige Geduld und die anspornende und verständnisvolle Unterstützung, durch die auch die Arbeiten in Göteborg und Frankfurt am Main möglich waren. Daß diese Arbeit in der vorliegenden Form gefertigt wurde, verdanke ich seiner konstruktiven Kritik und aufopferungsvollen praktischen Begleitung.

In diesem Zusammenhang sei auch das Institut für Informatik der Humboldt-Universität genannt, dessen technische Mittel ich bei der Erstellung der Arbeit nutzen durfte.

Nadja Richter